



## Sistema reprodutivo atípico de duas espécies de Rubiaceae: distília com autoincompatibilidade parcial no morfo brevistilo?

*Atypical mating system in two Rubiaceae species: distyly with partial self-incompatibility in the thrum morph?*

Raphael Matias<sup>1</sup>, Alexandre Silva de Oliveira<sup>2</sup>, Marco Túlio Furtado<sup>1</sup>, Túlio Sá<sup>3</sup>,  
Ebenézer Barbosa Rodrigues<sup>4</sup>, Paulo Eugênio de Oliveira<sup>4</sup> & Hélder Consolaro<sup>5,6</sup>

### Resumo

Espécies distílicas possuem populações com dois morfos florais. O morfo longistilo possui flores com pistilos longos e estames curtos e o morfo brevistilo, pistilos curtos e estames longos. Normalmente, os morfos apresentam um sistema heteromórfico de incompatibilidade e os morfos estão em uma razão de 1:1 (isopleτία) nas populações. Diferentes variações podem ser encontradas em espécies distílicas, como a presença de autocompatibilidade, anisopleτία e variações no nível de reciprocidade entre anteras e estigmas dos dois morfos. O objetivo desse trabalho foi investigar a ocorrência das características distílicas em duas espécies de Rubiaceae. Para isso, a razão dos morfos, a hercogamia recíproca, o sistema de incompatibilidade e os visitantes florais de *Psychotria deflexa* e *Declieuxia fruticosa* foram estudados. Ambas as espécies apresentaram os dois morfos em proporção semelhante, altos valores de reciprocidade entre a altura dos verticilos sexuais dos morfos florais e apenas insetos como visitantes florais. O morfo brevistilo das duas espécies apresentou autoincompatibilidade parcial. Dentro de Rubiaceae, mesmo em grupos filogenéticos distintos, o relaxamento ou quebra da distília parece ocorrer em padrões similares e comumente tal variação é mais comum no morfo longistilo. Para as espécies estudadas, mesmo com a pseudocompatibilidade do morfo brevistilo, as populações apresentaram proporção igual dos morfos, indicando que fatores como a alta hercogamia recíproca e, possivelmente, o serviço de polinização podem promover a manutenção da isopleτία característica da distília.

**Palavras-chave:** heterostilia, isopleτία, polimorfismo floral, polinização, sistema de incompatibilidade.

### Abstract

Distylous species have populations with two floral morphs. The pin morph has long pistils and short stamens while the thrum morph presents short pistils and long stamens. Usually heterostylous plants present a diallelic system of incompatibility and morphs occur in a 1:1 ratio (isoplethy) in the populations. Different forms of variations occur in distylous species, such as the presence of self-compatibility, anisoplethy and variation in the reciprocity level between anthers and stigmas of the two floral morphs. The aim of this study was to investigate the occurrence of the distylous characteristics in two Rubiaceae species. For this purpose, morph ratio, reciprocal herkogamy, incompatibility system and flower visitors of *Psychotria deflexa* and *Declieuxia fruticosa* were studied. Both species have the two floral morphs in equal ratio, high reciprocity values for height of the reproductive whorls of the floral morphs and were visited only by insects. However, the thrum morph on both species presented partial self-incompatibility. Within the Rubiaceae, even in distinct phylogenetic groups, weakening or breakdown of distyly seems to occur in similar patterns, but deviations in the incompatibility system have been mostly recorded for the pin morph of distylous species. In the studied species the populations had equal morph ratio despite the pseudocompatibility of the thrum morph, which indicates that factors such as high reciprocal herkogamy and possibly efficient pollination services could promote the maintenance of distyly in these species.

**Key words:** heterostyly, isoplethy, floral polymorphism, pollination, incompatibility system.

<sup>1</sup> Universidade de Brasília, Programa de Pós-Graduação em Botânica, Inst. Ciências Biológicas, Campus Darcy Ribeiro, Depto. Botânica, C.P. 04457, 70919-970, Brasília, DF, Brasil.

<sup>2</sup> Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, Brasil.

<sup>3</sup> Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-graduação em Botânica, R. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE, Brasil.

<sup>4</sup> Universidade Federal de Uberlândia, Inst. Biologia, Campus Umuarama, bloco 2D, 38400-902, Uberlândia, MG, Brasil.

<sup>5</sup> Universidade Federal de Goiás, Regional Catalão, Inst. Biotecnologia, Ciências Biológicas, Av. Dr. Lamartine Pinto de Avelar, 1120, 75704-020, Catalão, GO, Brasil.

<sup>6</sup> Autor para correspondência: helderconsolaro@gmail.com

## Introdução

As angiospermas possuem, aproximadamente, 72% das espécies com flores hermafroditas (Jong & Klinkhamer 2005) e, muito embora, o hermafroditismo possa proporcionar uma maior economia de recursos devido as funções masculina e feminina estarem dentro de uma mesma flor (Charnov *et al.* 1976), a maior probabilidade de deposição de pólen no próprio estigma pode gerar impactos reprodutivos negativos (Barrett 2002a; Charlesworth & Willis 2009). Como resposta a essas questões, algumas plantas hermafroditas desenvolveram estratégias reprodutivas para prevenir a interferência entre as funções masculina e feminina, tais como a separação temporal (dicogamia) da maturação sexual e a separação espacial (hercogamia) dos órgãos sexuais dentro de uma mesma flor. Embora a dicogamia e a hercogamia sejam estratégias úteis, elas não conseguem evitar a autofertilização que pode ocorrer através da geitonogamia e autopolinização. O surgimento do sistema de incompatibilidade permitiu que as plantas mantivessem suas estruturas masculinas e femininas dentro de uma mesma unidade floral sem que houvesse autofertilização (Webb & Lloyd 1986; Barrett 2002a; Jong & Klinkhamer 2005; Pérez-Barrales 2005).

A heterostilia apresenta algumas estratégias dentre aquelas que previnem a autopolinização/ autofertilização, sendo considerado um polimorfismo floral que pode manifestar-se por meio de populações com três (tristilia) ou dois (distilia) morfotipos florais. A distilia é a condição mais comum da heterostilia, de maneira que populações em estado de equilíbrio tendem a apresentar metade dos indivíduos com flores de estilete curto e estames longos, denominados morfo brevistilo, e a outra metade com flores de estilete longo e estames curtos, denominados morfo longistilo (Darwin 1877; Bahadur 1968; Ganders 1979; Barrett 1992; Barrett & Shore 2008). A correspondência na altura das anteras e do estigma entre os morfos é denominada hercogamia recíproca (HR), sendo essa uma característica física para potencializar o fluxo de pólen entre os morfos. Juntamente ao aspecto morfológico, plantas heterostílicas, comumente, possuem um sistema de incompatibilidade dialélico esporófitico, nos quais somente cruzamentos entre os diferentes morfos florais, chamada de polinização legítima ou intermorfo, formam sementes férteis (Ganders 1979). O significado adaptativo e funcional da HR

mais aceito atualmente foi proposto por Darwin (1877), sendo considerado um mecanismo floral que promove a polinização cruzada intermorfo mediada pelos polinizadores.

A distilia originou-se múltiplas vezes em um contexto macroevolutivo e variações nas características desse sistema reprodutivo são frequentes. Dentre as formas atípicas da heterostilia incluem a homostilia (posicionamento dos verticilos reprodutivos masculinos e femininos na mesma altura), o monomorfismo (populações com apenas um dos morfos) e também alterações e/ou perdas do sistema de incompatibilidade (Hamilton 1990; Barrett 1992). Alguns estudos com espécies da família Rubiaceae apontam que o sistema de incompatibilidade parece ser um dos principais responsáveis pela manutenção da distilia (Coelho & Barbosa 2004; Castro *et al.* 2004; Teixeira & Machado 2004; Lopes & Buzato 2005; Silva 2007). Porém outros estudos com espécies de *Psychotria* (Rubiaceae) mostram que o sistema de incompatibilidade parece não atuar de modo esperado quando há desequilíbrio na manifestação dos morfos florais, especialmente quando ocorre monomorfismo (Sakai & Wright 2008).

Alguns trabalhos discutem que variações no sistema de incompatibilidade pode ser resultado do relaxamento ou da perda da incompatibilidade podendo causar a quebra de todo o sistema distílico (Lloyd & Webb 1992; Barrett & Shore 2008), sendo, aparentemente, mais registrado no morfo longistilo (Lenza *et al.* 2008; Novo 2010; Faria *et al.* 2012). Em muitos casos, a evolução de diferentes graus de eficácia na autocompatibilidade em espécies distílicas parece ser uma condição selecionada para segurança reprodutiva, sobretudo quando populações estão sob algum tipo de pressão seletiva (Schemske & Lande 1985; Barrett & Shore 1987; Schoen *et al.* 1997). Qualquer tipo de variação, tanto no aspecto morfológico quanto no fisiológico, podem ocorrer entre espécies cogenéricas e até mesmo entre indivíduos de uma população (Ganders 1979; Hamilton 1990; Faivre & Mcdade 2001), deste modo estudos sobre o sistema reprodutivo, morfometria floral e razão entre os morfos florais em populações de diferentes espécies distílicas são importantes para o entendimento do significado adaptativo deste polimorfismo (Faria 2010).

Rubiaceae é a família com maior número de espécies distílicas dentre as 28 famílias de angiospermas que apresentam este polimorfismo (Hamilton 1990; Faivre & Mcdade 2001). Estudos

com espécies distílicas de Rubiaceae nos trópicos têm demonstrado uma gama de variações nos padrões heterostílicos, independentemente, das relações filogenéticas dos táxons (*e.g.*, Sakai & Wright 2008; Ferrero *et al.* 2012). Os gêneros *Psychotria* e *Declieuxia* fazem parte da subfamília Rubiodeae, porém se encontram em tribos distintas (Psychotrieae e Coussareae, respectivamente). A distília é tida como um caráter primitivo na subfamília, nas tribos e nos gêneros mencionados acima, entretanto suas espécies apresentam diferentes alterações nas características do polimorfismo, sobretudo no que diz respeito ao sistema de incompatibilidade e a hercogamia recíproca. Assim, estudos com espécies distílicas de diferentes gêneros e tribos representam uma oportunidade para entender melhor os caminhos evolutivos que tais espécies podem seguir, permitindo uma interpretação mais ampla dos processos ecológicos e funcionais envolvidos na manutenção ou quebra da distília. Para isso, o objetivo deste estudo foi analisar a biologia floral, razão entre morfos, hercogamia recíproca, sistema de incompatibilidade e os visitantes florais de *Psychotria deflexa* DC. e *Declieuxia fruticosa* (Willd. ex Roem. & Schult.) Kuntze (Rubiaceae).

## Material e Métodos

### Espécies estudadas e áreas de estudo

*Psychotria deflexa* é uma erva ou subarbusto de 50–150 cm de altura, distribuídas em sub-bosque de formações florestais, enquanto que *Declieuxia fruticosa* é um subarbusto ou arbusto de 7–150 cm de altura, encontrada em formações savânicas (Delprete 2010). *Declieuxia fruticosa* é considerada a mais complexa e variável espécie do gênero, tendo também o maior número de caracteres primitivos (Kirkbride 1976). Não há informação a respeito do sistema reprodutivo de ambas as espécies, porém sabe-se que apresentam flores brancas, diminutas, síndrome entomofílica e que florescem a partir de novembro, mas com duração de floração bem diferenciada, sendo um mês para *P. deflexa* e sete para *D. fruticosa*.

O estudo foi desenvolvido entre o período de setembro de 2003 a abril de 2005 em uma população de *P. deflexa* localizada na Estação Ecológica do Panga (EEP - 19°09'20''S e 48°23'20''W) e em duas populações de *D. fruticosa* localizadas também na EEP e na reserva particular do Clube de Caça e Pesca Itororó (CCPI - 18°59'21''S e 48°18'06''W), ambas no município de Uberlândia,

Minas Gerais, Brasil. Apesar de *D. fruticosa* ter sido estudada em duas áreas, dados de biologia e atributos florais, razão entre morfos e sistema reprodutivo foram coletadas, exclusivamente, na EEP e os de visitantes florais coletados apenas na CCPI. A EEP é uma reserva particular do patrimônio natural (RPPN) pertencente à Universidade Federal de Uberlândia desde o ano de 1986. Sua área é de 409,5 ha, apresentando uma vegetação com excelente representatividade dos diferentes tipos de fisionomias vegetais encontrados na região dos Cerrados do Brasil Central (Schiavini & Araújo 1989). Já o CCPI é de propriedade particular e possui, aproximadamente, 400 ha, sendo o cerrado típico a formação predominante.

O clima da região é classificado como Aw megatérmico, tratando-se de clima tropical úmido com inverno seco (Köppen 1948). As duas estações presentes na região são bem definidas, sendo caracterizadas por um período de alto índice pluviométrico, que vai de outubro a março, e outro de estiagem, de abril a setembro. Exemplares botânicos das espécies estudadas foram coletados, herborizados e incorporados no Herbarium Uberlandense - HUFU (Uberlândia, Minas Gerais, Brasil), sob os números de registro 41923, 41924, 41927, 41928 para *P. deflexa* e 41925, 41929 para *D. fruticosa*.

### Biologia e atributos florais

Todas as características descritas para as flores, como coloração, início da antese (definida pela separação dos lóbulos da corola), longevidade floral (a partir do início da antese até o período em que a corola se desprendia do receptáculo), recurso oferecido, receptividade estigmática (a partir da separação dos lóbulos estigmáticos) e período de exposição do pólen foram obtidas por observações diretas no campo, em no mínimo 20 indivíduos de cada espécie.

A morfometria floral foi estudada em flores coletadas e armazenadas em álcool 70%. Para captar possíveis variações individuais, foram coletadas 40 flores por morfo, distribuídas em 10 indivíduos de cada espécie. Em cada flor, foram obtidas medidas de comprimento e diâmetro de abertura do tubo da corola, altura dos estames (do início do filete até a porção média das anteras) e altura do estigma. A altura do estigma foi calculada pela soma do comprimento do estilete (da base da corola até a base do estigma) e metade do comprimento dos lóbulos estigmáticos (da base do estigma até o seu ápice). Esse cálculo foi aplicado para não

superestimar a altura do estigma, uma vez que ele é bífido e, em condições naturais, se encontrar aberto. As medidas foram obtidas com auxílio de paquímetro com precisão de 0,1 mm.

As medidas de reciprocidade da altura do estigma de um morfo com a altura dos estames de outro morfo (HR) foram avaliadas pelo índice de reciprocidade desenvolvido por Sánchez *et al.* (2013). Esse índice se baseia na comparação da altura dos estames de cada flor com a altura do estigma de todas as flores do morfo oposto. Nesta análise, a reciprocidade é avaliada de forma conjunta ( $R_2$  - índice de reciprocidade), sendo que os valores deste índice variam de zero (reciprocidade mínima) a um (reciprocidade perfeita). Valores abaixo de um ocorrem quando a reciprocidade não é perfeita e são modulados pela média dos desvios padrões das diferenças de altura. Logo, quanto maior a dispersão desses valores maior será o afastamento do valor um (Sánchez *et al.* 2013).

A razão entre morfos foi averiguada utilizando-se o método de varredura, no qual os indivíduos foram morfotipados (brevistilo ou longistilo), aleatoriamente, nas populações. Foi utilizado o teste de Qui-quadrado para analisar, estatisticamente, se a razão entre morfos era diferente da ocorrência equilibrada de 1:1 (BioEstat 5.0; Ayres *et al.* 2007).

### Sistema reprodutivo

O sistema reprodutivo das duas espécies foi investigado a partir de polinizações manuais realizadas em flores, previamente, ensacadas para evitar contato com grãos de pólen originados de doadores não identificados. As polinizações manuais foram realizadas em 20 indivíduos de cada espécie (dez de cada morfo floral) com 40 flores por tratamento para *Psychotria deflexa* (três a cinco flores por tratamento em cada indivíduo) e 15 flores para *Declieuxia fruticosa* (uma a duas flores por tratamento em cada indivíduo). Os seguintes tratamentos foram realizados: a) autopolinização manual: flores foram polinizadas com grãos de pólen da própria flor; b) apomixia: botões em pré-antese foram apenas emasculados, sem receber tratamento posterior; c) polinização cruzada intramorfo: flores de um morfo receberam grãos de pólen de flores do mesmo morfo, mas de indivíduos diferentes; d) polinização cruzada intermorfo: flores de um morfo receberam grãos de pólen de flores de outro morfo; e) polinização natural (controle): flores foram apenas marcadas

para avaliar a eficiência da polinização natural. Após totalmente formados, os frutos foram quantificados e foi utilizado o teste Exato de Fisher para comparar a frutificação entre os tratamentos e entre os morfos.

Foi calculado, paralelamente as análises estatísticas, o índice de autoincompatibilidade (ISI), com o intuito de identificar o tipo de sistema reprodutivo das duas espécies. O ISI é determinado pela razão entre a proporção de frutos formados por autopolinização e por polinização cruzada intermorfo. De acordo com o índice, valores abaixo de 0,25 são considerados como autoincompatíveis (Bullock 1985). Valores entre 0,25 e 0,75 indicam autoincompatibilidade com algum nível de autocompatibilidade (chamado de pseudocompatibilidade), e valores acima de 0,75 indicam autocompatibilidade (Lloyd & Schoen 1992). Também foi calculado o índice de eficácia reprodutiva (IER), dado pela razão entre a produção de frutos do tratamento controle e da polinização cruzada legítima (Ruiz & Arroyo 1978). Valores do IER acima de 0,66 indicam alta eficácia reprodutiva das espécies decorrente de um fluxo de pólen promovido pelos polinizadores (Ruiz & Arroyo 1978) e valores semelhantes ou inferiores a 0,25 indicam limitação de pólen (Sobrevilla & Arroyo 1982). Apesar desta medida de eficácia reprodutiva estimar a produção de frutos sob condições de máxima polinização (IER=1), valores superiores a 1 podem ser encontrados quando a produção de frutos do tratamento controle for maior que da polinização cruzada legítima, indicando polinizadores altamente eficientes.

### Visitantes florais

Para o estudo dos visitantes florais nas duas espécies, foram realizadas observações diretas no campo. Os registros dos visitantes florais foram realizados ao longo de todo o período de floração em dias não contínuos, totalizando cerca de 20 horas de observação por espécie. No momento das visitas, os insetos visitantes foram capturados com rede entomológica e sacrificados em campo com acetato de etila. A captura dos insetos era realizada apenas quando houvesse suspeita de ser uma nova espécie de visitante interagindo com as flores estudadas. Em laboratório, os visitantes coletados foram fixados e, posteriormente, identificados por especialistas. Durante as visitas, também foi analisado o comportamento dos visitantes nas flores (polinizador: quando ocorria o contato de alguma parte do corpo do visitante com as anteras



e estigma da flor; pilhador: quando o recurso era coletado sem que o visitante contatasse as estruturas reprodutivas).

## Resultados

### Biologia e atributos florais

As flores de *Psychotria deflexa* e *Declieuxia fruticosa* são brancas, hermafroditas, formam um tubo curto (*P. deflexa*:  $3,98 \pm 0,49$  mm de comprimento para ambos os morfos; *D. fruticosa*:  $3,48 \pm 0,47$  mm de comprimento para brevistila e  $3,87 \pm 0,67$  mm para longistila) com abertura estreita (*P. deflexa*:  $1,67 \pm 0,14$  mm de diâmetro

para brevistila e  $1,55 \pm 0,21$  mm para longistila; *D. fruticosa*:  $1,84 \pm 0,17$  mm de diâmetro para brevistila e  $1,74 \pm 0,21$  mm para longistila), possuem simetria radial (Fig. 1) e se encontram dispostas em inflorescências terminais cimosas. Apresentam odor adocicado e possuem uma longevidade floral em torno de 24 horas. O início da antese das flores de *P. deflexa* ocorre até duas horas antes (das 5 h 30 min às 6 h 30 min) da verificada em *D. fruticosa* (das 7 h 30 min às 8 h 30 min). No início da antese, as anteras já se encontram deiscidas e o estigma receptivo. O néctar, recurso floral ofertado, é secretado desde o início da antese por um nectário, em forma de disco,

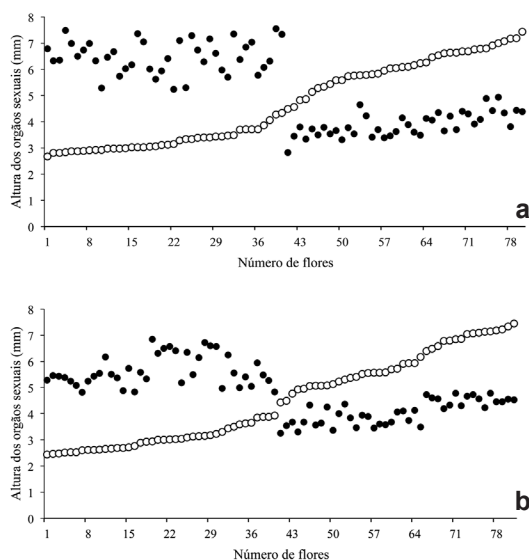


**Figura 1** – Flores de *Psychotria deflexa* DC. e *Declieuxia fruticosa* (Willd. ex Roem. & Schult.) Kuntze (Rubiaceae). – a. flor longistila de *Psychotria deflexa*. b. flor brevistila de *Psychotria deflexa*. c. flor longistila de *Declieuxia fruticosa*. d. flor brevistila de *Declieuxia fruticosa*.

**Figure 1** – Flowers of *Psychotria deflexa* DC. and *Declieuxia fruticosa* (Willd. ex Roem. & Schult.) Kuntze (Rubiaceae). – a. pin flower of *Psychotria deflexa*. b. thrum flower of *Psychotria deflexa*. c. pin flower of *Declieuxia fruticosa*. d. thrum flower of *Declieuxia fruticosa*.

que está localizado ao redor do ovário. O androceu é formado por cinco estames férteis em *P. deflexa* e quatro em *D. fruticosa*. Eles são dialistêmones e epipétalos, cujas anteras rimosas são alvas em *P. deflexa* (Fig. 1b) e violáceas em *D. fruticosa* (Fig. 1d). Em ambas as espécies, os estames estão dispostos na corola de forma concêntrica, porém, especificamente no morfo brevistilo de *P. deflexa*, eles se encontram reunidos de um único lado na porção superior da corola (Fig. 1b).

As duas espécies apresentaram as características morfológicas e populacionais típicas da distília, tais como a presença de flores dos morfos longistilo e brevistilo (Fig. 1), isopleia e hercogamia recíproca (Fig. 2). Foram encontrados 53 indivíduos longistilos e 47 brevistilos de *P. deflexa* e 49 longistilos e 51 brevistilos de *D. fruticosa*, sendo que a razão dos morfos não diferiu significativamente do esperado em nenhuma das



**Figura 2** – a. variação na altura das anteras (●) e dos estigmas (○) em flores de *Psychotria deflexa* DC (Rubiaceae). b. variação na altura das anteras (●) e dos estigmas (○) em flores de *Declieuxia fruticosa* (Willd. ex Roem. & Schult.) Kuntze (Rubiaceae). As flores mensuradas foram ordenadas de forma crescente pela altura do estigma para ilustrar a reciprocidade entre os órgãos sexuais em cada morfo.

**Figure 2** – a. variation in height of the anthers (●) and stigmas (○) in flowers *Psychotria deflexa* DC (Rubiaceae). b. variation in height of the anthers (●) and stigmas (○) in flowers *Declieuxia fruticosa* (Willd. Ex Roem. & Schult.) Kuntze (Rubiaceae). The measured flowers were ordered in ascending order by the stigma height, to illustrate the reciprocity between the sexual organs in each morph.

duas espécies (*P. deflexa*:  $\chi^2 = 0,36$ ; d.f. = 1;  $P = 0,617$ ; *D. fruticosa*:  $\chi^2 = 0,04$ ; d.f. = 1;  $P = 0,920$ ). Foi encontrada uma hercogamia recíproca alta entre os morfos florais das duas espécies ( $R_2 = 0,75$  e  $R_2 = 0,88$  em *P. deflexa* e *D. fruticosa*, respectivamente).

### Sistema reprodutivo

As duas ferramentas utilizadas para definir o sistema reprodutivo das espécies mostraram situações distintas. De acordo com as análises estatísticas, o morfo brevistilo de *Psychotria deflexa* não apresentou diferença significativa entre os tratamentos de auto polinização e polinização cruzada, indicando autocompatibilidade, enquanto para *Declieuxia fruticosa* estas diferenças foram significativas indicando um sistema de incompatibilidade funcional. Considerando os limites comumente utilizados para o índice de autoincompatibilidade (ISI), ambas as espécies apresentaram incompatibilidade parcial no morfo brevistilo.

Os morfos brevistilo e longistilo nas duas espécies estudadas produziram a mesma quantidade de frutos entre os morfos quando os dados são avaliados dentro de um mesmo tratamento de polinização (Tab. 1). Entretanto, houve diferença significativa entre os diferentes tratamentos quando a comparação é feita no mesmo morfo floral. Por exemplo, para o morfo brevistilo de *P. deflexa* a produção de frutos por polinização cruzada intermorfo não foi significativamente diferente da polinização cruzada intramorfo ( $P = 0,196$ ), o que indica algum nível de autocompatibilidade. Este resultado não foi encontrado para o morfo longistilo da mesma espécie. Em *D. fruticosa*, a produção de frutos por polinização cruzada intermorfo foi, significativamente, maior do que a polinização cruzada intramorfo nas flores brevistilas ( $P = 0,008$ ) e longistilas ( $P = 0,001$ ), indicando efeito de autoincompatibilidade nos dois morfos.

Ambas as espécies indicaram a presença de incompatibilidade parcial no morfo brevistilo, pois apresentaram valores de ISI iguais a 0,31 para *P. deflexa* e 0,30 para *D. fruticosa* (Tab. 1). Já o morfo longistilo foi considerado autoincompatível nas duas espécies, pois apresentaram valores de 0,07 para *P. deflexa* e 0,18 para *D. fruticosa*. As duas espécies não formaram frutos por apomixia e apresentaram valores elevados ( $> 0,66$ ) para o índice de eficácia reprodutiva (IER), demonstrando a eficiência dos polinizadores em promover o fluxo de pólen nas espécies estudadas (Tab. 1). Além disso, o morfo longistilo de *D. fruticosa* produziu

**Tabela 1** – Avaliação do sistema reprodutivo de *Psychotria deflexa* DC. e *Declieuxia fruticosa* (Willd. ex Roem. & Schult.) Kuntze (Rubiaceae) na Estação Ecológica do Panga, município de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. Os valores de porcentagens correspondem ao sucesso reprodutivo (número de flores que originaram frutos) de cada tratamento. **Table 1** – Evaluation of the reproductive system of *Psychotria deflexa* DC. and *Declieuxia fruticosa* (Willd. ex Roem. & Schult.) Kuntze (Rubiaceae) in the Panga Ecological Station, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. The percentages of values correspond to reproductive success (number of flowers that originated fruits) of each treatment.

Tratamentos	<i>Psychotria deflexa</i>		<i>Declieuxia fruticosa</i>	
	Brevistilo	Longistilo	Brevistilo	Longistilo
	% (frutos/flor)	% (frutos/flor)	% (frutos/flor)	% (frutos/flor)
Polinização natural - controle	30 (12/40)aA	25 (10/40)abA	53,3 (8/15)abA	86,7 (13/15)aA
Polinização cruzada intermorfo	32,5 (13/40)aA	37,5 (15/40)aA	66,6 (10/15)aA	73,3 (11/15)aA
Polinização cruzada intramorfo	17,5 (7/40)abA	12,5 (5/40)bcA	13,3 (2/15)bcA	6,7 (1/15)bA
Autopolinização manual	10 (4/40)bcA	2,5 (1/40)cA	20 (3/15)bcA	13,3 (2/15)bA
Apomixia	0 (0/40)cA	0 (0/40)cA	0 (0/15)cA	0 (0/15)bA
Índice de autoincompatibilidade (ISI)	0,31	0,07	0,30	0,18
Índice de eficácia reprodutiva (IER)	0,92	0,67	0,80	1,18

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre tratamentos, e letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre morfos.  $p < 0,05$  (Exato de Fisher) – Avaliações realizadas para cada espécie separadamente.

mais frutos em polinização natural do que em polinização cruzada intermorfo, apresentando valor de IER maior que 1.

#### Visitantes florais

Foram registrados indivíduos de 36 espécies visitando as flores de *Declieuxia fruticosa*, enquanto apenas indivíduos de três espécies visitaram as flores de *Psychotria deflexa*. Todos os visitantes

florais utilizaram o néctar como recurso. *Declieuxia fruticosa* recebeu visitas de abelhas, vespas, moscas, borboletas, mariposas e formigas, sendo que apenas o último grupo apresentou comportamento de pilhador (Tab. 2). Abelhas e vespas, com 19 e 10 espécies registradas respectivamente, foram os grupos que apresentaram maior riqueza de visitantes. Em *P. deflexa*, abelhas da família Halictidae foram os únicos visitantes observados (Tab. 2).

**Tabela 2** – Visitantes florais de *Psychotria deflexa* DC. na Estação Ecológica do Panga e de *Declieuxia fruticosa* (Willd. ex Roem. & Schult.) Kuntze (Rubiaceae) no Clube de Caça e Pesca Itororó de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. **Table 2** – Floral visitors of *Psychotria deflexa* DC. in the Panga Ecological Station and *Declieuxia fruticosa* (Willd. ex Roem. & Schult.) Kuntze (Rubiaceae) in Itororó Hunting and Fishing Club of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.

Ordem	Família	Espécie	<i>Declieuxia fruticosa</i>	<i>Psychotria deflexa</i>
Diptera	Bombyliidae	sp.	PO	-
	Syrphidae	sp.	PO	-
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis mellifera</i>	PO	-
		<i>Bombus morio</i>	PO	-
		<i>Centris nitens</i>	PO	-
		<i>Ceratina</i> sp. 1	PO	-
		<i>Ceratina</i> sp. 2	PO	-
		<i>Epicharis bicolor</i>	PO	-

Ordem	Família	Espécie	<i>Declieuxia fruticosa</i>	<i>Psychotria deflexa</i>
		<i>Isepeolus</i> sp.	PO	-
		<i>Melipona quinquefasciata</i>	PO	-
		<i>Mesonychiu masteria</i>	PO	-
		<i>Paratetrapedia</i> sp.	PO	-
		<i>Scaptotrigona</i> sp.	PO	-
		<i>Tetrapedia</i> sp.	PO	-
	Colletidae	<i>Ptiloglossa</i> sp.	PO	-
	Halictidae	<i>Augochlora</i> sp.	PO	PO
		<i>Augochloropsis</i> sp.	PO	PO
		<i>Pseudaugochlora</i> sp.	PO	PO
	Megachilidae	<i>Coelioxys</i> sp.	PO	-
		<i>Exomalopsis fulvofasciata</i>	PO	-
		<i>Megachile</i> sp.	PO	-
	Crabronidae	sp. 1	PO	-
		sp. 2	PO	-
	Pompilidae	<i>Pepsis</i> sp.	PO	-
	Scoliidae	<i>Campsomeris</i> sp.	PO	-
	Sphecidae	sp. 1	PO	-
		sp. 2	PO	-
		sp. 3	PO	-
	Vespidae	sp. 1	PO	-
		sp. 2	PO	-
		sp. 3	PO	-
Hemiptera		sp. 1	PI	-
		sp. 2	PI	-
Lepidoptera	Hesperiidae	<i>Urbanu sprotetus</i>	PO	-
		sp.	PO	-
	Pieridae	sp.	PO	-

PO: polinizador; PI: pilhador.

## Discussão

As flores de *Psychotria deflexa* e *Declieuxia fruticosa* apresentaram morfologia semelhante à de outras espécies de Rubiaceae. Espécies desta família possuem um sistema de polinização considerado especializado, pois suas flores com corola gamopétalas restringem o acesso a coleta de néctar, principalmente em espécies com tubo floral longo, de maneira que insetos de probóscide curta não conseguem ter acesso ao recurso (Amorim & Oliveira 2006; Consolaro *et al.* 2009; Machado

*et al.* 2010; Consolaro *et al.* 2011; Rodrigues & Consolaro 2013). Entretanto, as flores diminutas de tubo curto das duas espécies estudadas não impedem a visita de insetos com probóscide curta, tornando-as assim mais genéricas em relação às espécies de Rubiaceae com tubo floral mais longo. O tamanho, a coloração branca de suas flores e, sobretudo, a pequena quantidade de néctar produzido (obs. pess.) atraíram apenas polinizadores de pequeno porte. Esses polinizados parecem ser eficientes no fluxo de pólen legítimo,



uma vez que as espécies apresentaram um alto valor de IER e os resultados do tratamento de polinização natural não foram significativamente diferentes aos das polinizações intermorfo.

*Psychotria deflexa* apresenta os estames do morfo brevistilo dispostos de forma agregada em um único lado na porção superior da corola e o pistilo do morfo oposto se encontra na posição correspondente, sendo essa, provavelmente, uma estratégia extra a HR para potencializar o fluxo de pólen do morfo brevistilo para o longistilo. Os estames de *D. fruticosa* não possuem a mesma arquitetura estaminal, porém o anel de tricomas presente internamente ao tubo floral, também encontrado em *P. deflexa*, podem auxiliar na deposição de pólen em partes específicas no corpo do polinizador, evitar a interferência de autopólen e/ou amenizar a incompatibilidade parcial do morfo brevistilo. Estudos funcionais teriam que ser desenvolvidos para saber o verdadeiro papel do anel de tricomas nas espécies de Rubiaceae e se a disposição agregada dos estames do morfo brevistilo auxilia de fato o fluxo de pólen e/ou causa algum diferencial unidirecional de pólen a favor do morfo longistilo.

O índice de Sanchez *et al.* (2013) indica que as espécies estudadas possuem alta reciprocidade entre os órgãos reprodutivos dos morfos florais. Para considerar que uma espécie seja tipicamente distílica, alguns critérios são indicados, como a presença de HR, populações em isoplelia e sistema de incompatibilidade esporofítico (Darwin 1887; Ganders 1979; Barrett 1992; Faivre & McDade 2001; Barrett & Shore 2008). Alguns modelos evolutivos da distílica consideram que a HR é uma condição primária ao sistema de incompatibilidade (Lloyd & Webb 1992) e que essa estratégia física promove uma maior aptidão do sexo masculino, uma vez que potencializa a polinização cruzada intermorfo e, assim, reduz o desperdício de pólen (Barrett 2002b). A falta de uma reciprocidade entre os órgãos reprodutivos pode acarretar efeitos negativos, pois alguns autores afirmam que quanto menor é a HR entre os morfos, menor será a chance dos polinizadores transportarem pólen legítimo entre os morfos (Bramow *et al.* 2013; Thompson *et al.* 2012). Em contraste, em *P. deflexa* e *D. fruticosa* a alta reciprocidade entre os morfos florais pode ser um dos fatores responsáveis pelo considerável sucesso reprodutivo no tratamento de polinização natural em ambos os morfos.

As duas espécies estudadas apresentaram semelhanças em suas características distílicas,

como populações em isoplelia com alto índice de reciprocidade entre os morfos florais. Da mesma forma as anomalias encontradas nas duas espécies também foram semelhantes, como o relaxamento/flexibilização do sistema de incompatibilidade (autoincompatibilidade parcial segundo o ISI) no morfo brevistilo. Estudos filogenéticos afirmam que as tribos Coussareae e Psychotrieae, as quais pertencem os gêneros *Declouxia* e *Psychotria*, respectivamente, constituem clados irmãos, sendo Coussareae uma tribo mais ancestral (~ 65 Ma) em relação à Psychotrieae (~ 50 Ma) (Bremmer & Erickson 2009). Variações na distílica encontradas em espécies de *Psychotria* e *Palicourea* (gêneros pertencentes à mesma tribo - Psychotrieae), como presença de homostílica, monomorfismo e/ou a autocompatibilidade em algumas populações da mesma espécie, demonstram que diferentes anomalias podem ocorrer em *taxa* com proximidade filogenética ainda maior (Consolaro *et al.* 2009; Machado *et al.* 2010; Consolaro *et al.* 2011; Faria *et al.* 2012). Um trabalho clássico de evolução da heterostílica discute que este polimorfismo floral surgiu de forma independente, pelo menos, 23 vezes nas angiospermas (Lloyd & Webb 1992). É possível pensar que a distílica possui uma versatilidade quanto aos caminhos evolutivos, não sendo possível dizer atualmente quantas vezes a distílica teria sido originado em um contexto macroevolutivo nas plantas com flores. Assim, variações distílicas semelhantes, como as encontradas em *D. fruticosa* e *P. deflexa*, podem ser originadas de processos evolutivos independentes das relações filogenéticas entre as espécies.

Mas a autoincompatibilidade parcial registrada no morfo brevistilo de *D. fruticosa* e *P. deflexa* é uma situação rara em espécies distílicas, uma vez que são mais comuns as variações no sistema de incompatibilidade do morfo longistilo (Lenza *et al.* 2008; Novo 2010; Faria *et al.* 2012). A autoincompatibilidade parcial também foi encontrada no morfo longistilo de *Villarsia lasiosperma* F. Muell. (Menyanthaceae) (Ornduff 1992) e nos morfos longistilo e brevistilo de *Palicourea padifolia* (Humb. & Bonpl. ex Schult.) C.M. Taylor & Lorence (Rubiaceae) (Contreras & Ornelas 1999). Muitos estudos de biologia reprodutiva demonstram que o morfo brevistilo apresenta um sistema de incompatibilidade mais estável do que o morfo longistilo (Darwin 1877; Bahadur 1966; Ornduff 1971) e é sugerido que essa diferenciação existe, provavelmente, pelo sistema de incompatibilidade ter evoluído de modo

independente em cada morfo floral (Loydd & Webb 1992). Entretanto, a diferença na expressão da atividade do sistema de incompatibilidade entre os morfos florais de *D. fruticosa* e *P. deflexa* não é percebida nos valores de frutificação entre os morfos e na isopleτία das duas populações estudadas. Vários outros fatores a posteriori, tais como diferenças na taxa de germinação e na sobrevivência de plântulas obtidas após autopolinização e polinização cruzada intermorfo, podem explicar a manutenção da isopleτία em populações que apresentam variações no sistema de incompatibilidade.

O sistema de incompatibilidade é uma estratégia versátil e diversificada de reprodução presente nas espécies vegetais e variações nesse sistema podem não representar a perda total de sua função, mas sim a modificação de sua expressão como resposta plástica a processos fisiológicos ou a fatores ambientais (Vallejo-Marín & Uyenoyama 2008). Teoricamente, fenótipos com variações no sistema de autoincompatibilidade podem se fixar nas populações vegetais, levando a um polimorfismo estável de pseudo-autofertilização (Good-Avila et al. 2008). A autoincompatibilidade parcial de *P. deflexa* e *D. fruticosa* pode levar a uma fertilização mista, permitindo a fecundação oriunda de duas fontes de pólen (legítima e ilegítima), resultando em um mecanismo de segurança reprodutiva para essas espécies. Assim, a autoincompatibilidade parcial pode favorecer a reprodução das espécies em situações adversas, como a de limitação polínica pela perda de polinizadores e/ou de perturbações no meio abiótico e biótico.

## Referências

- Ayres, M.; Ayres, D.L. & Santos, A.S. 2007. BioEstat: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas. Sociedade Civil Mamirauá, Belém. 290p.
- Bahadur, B. 1966. Heterostyly in *Oldenlandia scopulorum* Bull. Journal of Genetics 59: 267-272.
- Bahadur, B. 1968. Heterostyly in Rubiaceae: a review. Journal of Osmania University 7: 207-238.
- Barrett, S.C.H. 1992. Heterostylous genetic polymorphisms: model systems for evolutionary analysis. In: Barrett, S.C.H. (ed.). Evolution and function of heterostyly. Springer-Verlag, Berlin. Pp. 1-29.
- Barrett, S.C.H. 2002a. Sexual interference of the floral kind. Heredity 88: 154-159.
- Barrett, S.C.H. 2002b. The evolution of plant sexual diversity. Nature Genetics 3: 274-284.
- Barrett, S.C.H. & Shore, J.S. 1987. Variation and evolution of breeding systems in the *Turnera ulmifolia* complex (Turneraceae). Evolution 41: 340-354.
- Barrett, S.C.H. & Shore, J.S. 2008. New insights on heterostyly: comparative biology, ecology and genetics. In: Franklin-Tong, V.E. (ed.). Self-incompatibility in flowering plants: evolution, diversity, and mechanisms. Springer-Verlag, Berlin. Pp. 3-32.
- Bramow, C.; Hartvig, I.; Larsen, S.B. & Philipp, M. 2013. How a heterostylous plant species responds to life on remote islands: a comparative study of the morphology and reproductive biology of *Waltheria ovata* on the coasts of Ecuador and the Galápagos Islands. Evolutionary Ecology 27: 83-100.
- Bremmer, B. & Erickson, T. 2009. Time tree of Rubiaceae: phylogeny and dating the family, subfamilies, and tribes. International Journal of Plant Sciences 170: 766-793.
- Bullock, S.H. 1985. Breeding systems in the flora of a tropical deciduous forest. Biotropica 17: 287-301.
- Castro, C.C.; Oliveira, P. & Alves, M.C. 2004. Breeding system and floral morphometry of distylous *Psychotria* L. species in the Atlantic rain forest, SE, Brazil. Plant Biology 6: 760-775.
- Charlesworth, D. & Willis, J.H. 2009. Fundamental concepts in genetics: the genetics of inbreeding depression. Nature Reviews Genetics 10: 783-796.
- Charnov, E.L.; Smith, J.M. & Bull, J.J. 1976. Why be an hermaphrodite? Nature 263: 125-126.
- Coelho, C.P. & Barbosa, A.A. 2004. Biologia reprodutiva de *Psychotria poeppigiana* Mull. Arg. (Rubiaceae) em mata de galeria. Acta Botanica Brasilica 18: 481-489.
- Consolaro, H.; Toledo, R.D.P.; Ferreguti, R.L.; John, H. & Oliveira, P.E. 2009. Distilia e homostilia em espécies de *Palicourea* Aubl. (Rubiaceae) do Cerrado do Brasil Central. Revista Brasileira de Botânica 32: 677-689.
- Consolaro, H.; Silva, S.C.S. & Oliveira, P.E. 2011. Breakdown of distyly and pin monomorphism in *Psychotria carthagenensis* Jacq. (Rubiaceae). Plant Species Biology 26: 24-32.
- Contreras, P.S. & Ornelas, J.F. 1999. Reproductive conflicts of *Palicourea padifolia* (Rubiaceae) a distylous shrub of a tropical cloud forest in Mexico. Plant Systematics and Evolution 219: 225-241.
- Darwin, C.R. 1877. The different forms of flowers on plants of the same species. John Murray, London. 352p.
- Delprete, P.G. 2010. Flora dos estados de Goiás e Tocantins. Gráfica e Editora Vieira, Goiânia. 1610p.
- Favre, A.E. & McDade, L.A. 2001. Population - level variation in the expression of heterostyly in three species of Rubiaceae: does reciprocal placement of

- anthers and stigmas characterize heterostyly? *American Journal of Botany* 88: 841-853.
- Faria, R.R. 2010. Fenologia de floração, sistema reprodutivo e efetividade de polinização da espécie distílica *Psychotria carthagenensis* Jacq. (Rubiaceae) em áreas de cerrado, Campo Grande - MS. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande. 88p.
- Faria, R.R.; Ferrero, V.; Navarro, L. & Araujo, A.A. 2012. Flexible mating system in distylous populations of *Psychotria carthagenensis* Jacq. (Rubiaceae) in Brazilian Cerrado. *Plant Systematics and Evolution* 298: 619-627.
- Ferrero, V.; Rojas, D.; Vale, A. & Navarro, L. 2012. Delving into the loss of heterostyly in Rubiaceae: is there a similar trend in tropical and non-tropical climate zones? *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 14: 161-167.
- Ganders, F.R. 1979. The biology of heterostyly. *New Zealand Journal of Botany* 17: 607-635.
- Good-Avila, S.V.; Mena-Ali, J.I. & Stephenson, A.G. 2008. Genetic and environmental causes of variation in self-fertility in self-incompatible species. In: Franklin-Tong, V. (ed.). *Self-Incompatibility in flowering plants: evolution, diversity and mechanisms*. Springer, Heidelberg. Pp. 33-51.
- Hamilton, C.W. 1990. Variations on a distylous theme in Mesoamerican *Psychotria* subgenus *Psychotria* (Rubiaceae). *Memoirs of the New York Botanical Garden* 55: 65-75.
- Jong, T. & Klinkhamer, P. 2006. *Evolutionary ecology of plant reproductive strategies*. Cambridge University Press, New York. 333p.
- Kirkbride, J.H.Jr. 1976. A revision of the genus *Declieuxia* (Rubiaceae). *Memoirs of the New York Botanical Garden* 28: 1-87.
- Köppen, W. 1948. *Climatología: con un estudio de los climas de la tierra*. Fondo de Cultura Económica, México. 479p.
- Lenza, E.; Ferreira, J.N.; Consolaro, H. & Aquino, F.G. 2008. Biologia reprodutiva de *Rourea induta* Planch. (Connaraceae), uma espécie heterostílica de cerrado do Brasil Central. *Revista Brasileira de Botânica* 31: 389-398.
- Lloyd, D.G. & Schoen, D.J. 1992. Self - and cross - fertilization in plants. *Functional dimensions*. Vol. I. *International Journal of Plant Sciences* 153: 358-369.
- Lloyd, D.G. & Webb, C.J. 1992. The selection of heterostyly. In: Barrett, S.C.H. (ed.). *Evolution and function of heterostyly*. Springer-Verlag, Berlin. Pp. 179-207.
- Lopes, L.E. & Buzato, S. 2005. Biologia reprodutiva de *Psychotria suterella* Muell. Arg. (Rubiaceae) e a abordagem de escalas ecológicas para a fenologia de floração e frutificação. *Revista Brasileira de Botânica* 28: 785-795.
- Machado, A.O.; Silva, A.P.; Consolaro, H.; Barros, M.A.G. & Oliveira, P.E. 2010. Breeding biology and distyly in *Palicourea rigida* H.B. & K. (Rubiaceae) in the Cerrados of Central Brazil. *Acta Botanica Brasilica* 24: 686-696.
- Novo, R.R. 2010. Biologia reprodutiva de *Guettarda platypoda* DC. (Rubiaceae) em uma área de restinga no estado de Pernambuco. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 47p.
- Ornduff, O. 1971. The reproductive system of *Jepsonia heterandra*. *Evolution* 25: 300-311.
- Ornduff, O. 1992. Intrapopulation variation in the breeding system of *Villarsia lasiosperma* (Menyanthaceae), a distylous species. *Plant Systematics and Evolution* 180: 227-233.
- Pérez-Barrales, R. 2005. La evolución de la heterostilia en *Narcissus*: análisis macro y microevolutivo. PhD dissertation. University of Seville, Seville. 463p.
- Rodrigues, E.B. & Consolaro, H. 2013. Atypical distyly in *Psychotria goyazensis* Mull. Arg. (Rubiaceae), an intramorph self-compatible species. *Acta Botanica Brasilica* 27: 155-161.
- Ruiz, T.Z. & Arroyo, M.T.K. 1978. Plant reproductive ecology of a secondary deciduous tropical forest. *Biotropica* 10: 221-230.
- Sakai, S. & Wright, S.J. 2008. Reproductive ecology of 21 coexisting *Psychotria* species (Rubiaceae): when is heterostyly lost? *Biological Journal of the Linnean Society* 93: 125-134.
- Sánchez, J.M.; Ferrero, V. & Navarro, L. 2013. Quantifying reciprocity in distylous and tristylous plant populations. *Plant Biology* 15: 616-620.
- Schemske, D.W. & Lande, R. 1985. The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plants. *Empirical observations*. Vol. II. *Evolution* 39: 41-52.
- Schiavini, I. & Araújo, G.M. 1989. Considerações sobre a vegetação da Reserva Ecológica do Panga, Uberlândia, MG. *Sociedade & Natureza* 1: 61-66.
- Schoen, D.J.; Johnston, M.O.; L'Heureux, A.M. & Marsolais, J.V. 1997. Evolutionary history of the mating system in *Amsinckia* (Boraginaceae). *Evolution* 51: 1090-1099.
- Silva, C.A. 2007. Biologia reprodutiva de três espécies distílicas de *Psychotria* L. e efeitos da fragmentação florestal no sucesso reprodutivo e na diversidade genética de *P. hastisepala* Müll. Arg. (Rubiaceae). Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 63p.

- Sobrevilla, C. & Arroyo, M.T.K. 1982. Breeding systems in a montane tropical cloud forest in Venezuela. *Plant Systematics and Evolution* 140: 19-37.
- Teixeira, L.A.G. & Machado, I.C. 2004. Biologia da polinização e sistema reprodutivo de *Psychotria barbiflora* DC. (Rubiaceae). *Acta Botanica Brasílica* 18: 853-862.
- Thompson, J.D.; Cesaro, A.C. & Arroyo, J. 2012. Morph ratio variation and sex organ reciprocity in style dimorphic *Narcissus assoanus*. *International Journal of Plant Sciences* 173: 885-893.
- Vallejo-Marin, M. & Uyenoyama, M.K. 2008. On the evolutionary modification of self-incompatibility: implications of partial clonality for allelic diversity and genealogical structure. *In*: Franklin-Tong, V. (ed.). *Self-Incompatibility in flowering plants: evolution, diversity and mechanisms*. Springer, Heidelberg. Pp. 53-71.
- Webb, C. & Lloyd, D. 1986. The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigmas in angiosperms. *Herkogamy*. Vol. II. *New Zealand Journal of Botany* 24: 163-178.