



Programa de Pós Graduação em Ecologia e
Biomonitoramento
Universidade Federal da Bahia



Juliana Hipólito de Sousa



Ecologia e Biologia da Polinização de
***Aristolochia gigantea* (Aristolochiaceae)**
Mart. e Zucc.

Salvador

2011

Juliana Hipólito de Sousa

Ecologia e Biologia da Polinização de
Aristolochia gigantea (Aristolochiaceae) Mart.
e Zucc.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia, para a obtenção de Título de Mestre em Ecologia e Biomonitoramento.

Orientador(a): Blandina Felipe Viana

Salvador

2011

Ficha Catalográfica

CONFECCIONADA PELA BIBLIOTECA
CENTRAL-UFBA

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a). Isabel Cristina Machado

Prof(a). Dr(a).Miriam Gimenes

Prof(a). Dr(a). Blandina Felipe Viana

Orientador(a)

Agradecimentos

- Agradeço a Capes e ao Programa de Pós Graduação em Ecologia e Biomonitoramento pela bolsa durante os dois anos do desenvolvimento do mestrado;
- À minha orientadora Blandina Felipe Viana pela orientação e dedicação não apenas ao longo do mestrado, mas por toda minha jornada acadêmica e por ser um dos maiores exemplos de pesquisadora para mim;
- À ajuda e co-orientação dos professores Leonardo Galetto, Alessandra Schnadelbach e Érica Hasui e também pela paciência e disposição com a qual sempre me atenderam;
- Ao professor Peter Kevan pela paixão pela família *Aristolochiaceae* e por me inspirar com a idéia desta dissertação, mesmo com todos os problemas;
- À todos aqueles que me ajudaram no campo durante os trabalhos, pelas aventuras, longas caminhadas e noites não dormidas, agradeço com imenso carinho a Débora Santedicola, Ivan Abreu, Thiago Mahlmann, Luiz Antonio, Daniela Coelho, Luis Primo, Natanael Nascimento e Maria Van Dike;
- Aos integrantes do Laboratório de Biologia e Ecologia de Abelhas, especialmente a Eduardo Moreira e Débora Santedicola que me ajudaram em diversos momentos da minha dissertação;
- À Eudes Barleta pela ajuda em laboratório com as análises genéticas e a constante disposição em ajudar no trabalho com a espécie;
- A Fapesb pela bolsas concedida ao estudante de iniciação científica Eudes Barleta e ao CNPq pela bolsa concedida ao estudante Ivan Abreu (AT CNPq) me ajudando assim no desenvolvimento do trabalho;
- Agradeço à Fiocruz, mais ainda aos técnicos Cláudio e Adriana pelo uso do microscópio de fluorescência;
- Ao Instituto de Geofísica da Ufba pela doação de nitrogênio líquido diversas vezes;
- À todos os pesquisadores que me ajudaram com a identificação dos insetos encontrados nas flores do presente trabalho: Thiago Mahlmann (INPA) – ordens e famílias, Dr(a) Favízia Freitas de Oliveira (UFBA) – abelhas, Danilo Ament (USP) – Phoridae, Dr. Marco Gottschalk (FURG) – Drosophilidae, Dr. Jacques Delabie (UESC) – Formicidae, Dra. Susana Trivinho Strixino (UFSCAR) – Chironomidae, Dr. Claudio José Barros de Carvalho (UFPR) – Muscidae, Dr. Edilson Caron (UFPR) – Coleoptera, Valéria Cid Maia (UFRJ) – Cecidomyiidae;

- Agradeço também a todos da minha turma de mestrado e a convivência durante o curso;
- Agradeço imensamente a minha família, especialmente aos meus pais Celso e Dolores pela confiança, apoio, amor e preocupação;
- Agradeço por fim a todos os meus amigos que estiveram presentes durante todo o meu mestrado, dando apoio principalmente nos momentos mais difíceis, mas também estando presentes nos mais divertidos, em especial a mãe de Ivan, Dona Zeliene que sempre me acolheu com imenso carinho em sua casa durante as visitas ao campo, a Caique que se ocupou do monitoramento da população de Lençóis, as ilustrações realizadas por Natan e a uma amizade que surgiu nesse período, ao meu sócio e mais ainda grande amigo Thiago pelo apoio e por todos os bons momentos e constante preocupação mesmo nos períodos de desentendimentos.
- Mesmo não citando todos os nomes, agradeço a todos que fizeram parte mesmo que por instantes desta importante etapa da minha vida.

Índice

Introdução geral	08
Capítulo 1:	20
<i>Abstract</i>	21
Introdução	22
Materiais e Métodos	25
Resultados	30
Discussão	36
Agradecimentos	42
Literatura citada	43
Lista de tabelas e figuras	51
Capítulo 2:	61
<i>Abstract</i>	62
Introdução	63
Métodos	65
Resultados	67
Discussão	67
Referência	69
Apêndice	71
Conclusão geral	73
Referências da Introdução Geral	74
Anexos	81

Introdução Geral

1
2
3 A literatura clássica em ecologia da polinização baseia-se em uma visão adaptacionista, na
4 qual os polinizadores teriam características especializadas às flores que visitam e essas aos
5 seus polinizadores, sendo essas “adaptações” chamadas síndromes de polinização, onde a
6 habilidade dos polinizadores em acessar as flores seria o foco central dos estudos (Faegri &
7 van der Pijil 1979). Embora essa visão ainda perdure nos estudos atuais (e.g. Hingston &
8 McQuillan 2000, Pérez *et al.* 2009), pelo fato das síndromes serem bons guias que provêm
9 uma idéia inicial sobre a ecologia da polinização da planta, elas não devem ser utilizadas
10 exclusivamente para desenhar conclusões sem estudos empíricos. As interações entre plantas
11 e polinizadores são amplamente diversas e complexas para serem resumidas em alguns
12 poucos termos, como características fenotípicas das espécies (Ollerton & Watts 2000).

13 Mesmo nas espécies que parecem ter adaptações para tipos particulares de polinizadores,
14 observações detalhadas demonstram a ocorrência de múltiplos visitantes nas flores (Ollerton
15 1996). Assim, caracteres específicos utilizados para previsão das síndromes, como caracteres
16 florais nem sempre combinam perfeitamente com a morfologia dos polinizadores (Sakai *et al.*
17 1999).

18 Complementarmente, a associação da morfologia floral e função das plantas aos caracteres
19 energéticos, morfológicos e comportamentais dos polinizadores, pode não ter relação direta
20 com a origem de adaptações, pois a polinização pode ser realizada relativamente com sucesso
21 mesmo sem uma relação direta histórica com determinado grupo de polinizador, tratando-se
22 muitas vezes de exaptações ao invés de adaptações *sensu stricto* (Herrera 1996). Exaptações,
23 assim, sugerem características que não foram “desenhadas” para determinada função
24 propriamente, mas que existem por outras razões não relacionadas diretamente com pressões

1 seletivas, sendo cooptadas para um novo uso (Gould & Vrba 1982, Sepúlveda & El-Hani
2 2008).

3 Além da atração por recursos oferecidos pelas plantas, a presença de polinizadores e
4 flutuação destes nas comunidades, muitas vezes é influenciada pelo ambiente físico que age
5 como filtro das comunidades (Sargent & Ackerly 2008), através de características abióticas
6 (Andrieu *et al.* 2009) como por exemplo, características do micro habitat e/ou microclima
7 (Herrera 1995, Torres *et al.* 2007) ou até mesmo por fatores em maior escala, decorrentes das
8 mudanças climáticas globais (Torres *et al.* 2007). Além disso, a composição e a interação da
9 fauna visitante também pode ser reflexo do contexto da paisagem na qual a população está
10 inserida (Steffan-Dewenter *et al.* 2002, Devoto *et al.* 2005), revelando interações mais ou
11 menos especializadas (Warren *et al.* 1988, Kearns 1992, Torres *et al.* 2007).

12 Assim, mesmo quando muitos caracteres preditos pelas síndromes ocorrem, observam-se
13 variações na fauna visitante, como por exemplo, espécies de plantas com síndrome de
14 polinização noturna sendo mais eficientemente polinizadas por visitantes diurnos (Wolff *et al.*
15 2003, Giménez-Benavides *et al.* 2007), resultado da escassez de polinizadores por pressões
16 ambientais (Wolff *et al.* 2003).

17 Estudos têm demonstrado que espécies vegetais restritas a um único polinizador mais são
18 exceções do que regra (Waser *et al.* 1996, Wolff *et al.* 2003, Sakai *et al.* 1999). Entretanto,
19 apesar da maioria das espécies receber um espectro amplo de visitantes florais, nem todo
20 visitante é um polinizador eficiente para garantir o mesmo sucesso reprodutivo (Lau &
21 Galloway 2004, Carvalho & Machado 2006), conseqüentemente, para compreender a
22 complexidade das interações entre flores e visitantes é fundamental avaliar a eficiência dos
23 visitantes florais como polinizadores efetivos.

24 A exploração de recursos florais muitas vezes requer habilidades comportamentais dos
25 polinizadores para detectar sinais e associá-los aos recursos, além de habilidades

1 morfológicas e fisiológicas para explorá-los (Waser *et al.* 1996), tais aspectos podem
2 influenciar na eficiência do polinizador do ponto de vista da planta relacionado por exemplo,
3 ao tamanho do polinizador (Boggs 1988), do seu aparato bucal (Svensson *et al.* 1998,
4 Temeles *et al.* 2000), tempo gasto nas flores (Tepedino 1981, Keys *et al.* 1995, Singh 2008),
5 frequência de visitas (Tepedino 1981, Keys *et al.* 1995), e forrageamento (Carvalho &
6 Oliveira 2003). Essa associação de requerimentos do visitante com a sua capacidade de
7 transporte dos grãos de pólen das plantas podem diferenciar um visitante floral de um
8 polinizador efetivo, ou seja, aquele que realiza visitas legítimas, sem a retirada apenas do
9 recurso, mas contatando as partes reprodutivas da planta possibilitando sua fecundação.

10 Algumas espécies, realmente parecem ter estratégias especializadas que combinam suas
11 estruturas reprodutivas com a capacidade dos visitantes em adquirir os recursos, restringindo
12 a gama de visitantes que podem obter o recurso, e que podem de fato realizar a polinização,
13 como por exemplo, plantas com anteras poricidas (Laporta 2005), grande parte das orquídeas
14 com suas polínias (Weston *et al.* 2005), espécies do gênero *Ficus* e vespas (Chalcidoidea,
15 Agaonidae) (Murray 1985), *Yucca* sp. (Agavaceae) e as larvas de lepidópteros que se
16 desenvolvem em flores que serão polinizadas pelos adultos (Aker & Udovic 1981, Pellmyr &
17 Huth 1994), e flores com mecanismos de armadilhas (Dafni 1984), dentre muitos outros.

18 A especialização de uma planta a determinado grupo de polinizador, pode aumentar o seu
19 sucesso reprodutivo, pois normalmente implica em uma menor perda de pólen (Dafni 1984,
20 Wilcock & Neiland 2002). Por outro lado, morfologias florais mais especializadas, estariam
21 mais sujeitas às variações nos “serviços” de polinização (Waser *et al.* 1996), ou seja, o seu
22 sucesso reprodutivo correria maior risco decorrente da falha do transporte de pólen pela falta
23 de vetores especializados (Wilcock & Neiland 2002).

24 Variações nos “serviços” de polinização podem estar relacionadas à limitação de
25 polinizadores, pólen e/ou polinização, muitas vezes fruto da pressão antrópica em ambientes

1 naturais (Aizen & Feinsinger 1994, Kearns *et al.* 1998). Consequências como a diminuição
2 significativa do número de frutos, podem ser observadas (Berjano *et al.* 2011), assim como
3 influências na dinâmica populacional e viabilidade, com a limitação do recrutamento (Price *et*
4 *al.* 2008).

5 A limitação dos “serviços” de polinização, também pode ser consequência do isolamento
6 de populações, decorrente de processos como a fragmentação (Kearns *et al.* 1998), ou de
7 condições abióticas adversas como populações em locais de altitude na paisagem, que
8 impedem o deslocamento de polinizadores (Eriksen *et al.* 1993, Arroyo *et al.* 2006, Pérez *et*
9 *al.* 2009). Do ponto de vista do visitante floral, as implicações podem ocorrer em seu
10 comportamento, que normalmente é afetado (Goverde *et al.* 2002), interferindo nas distâncias
11 de forrageamento e densidades populacionais (Aizen & Feinsinger 1994).

12 Para as plantas, as taxas de polinização são afetadas (Cunningham 2000), reduzindo a
13 aptidão pelo decréscimo no número de óvulos fertilizados, de sementes maduras e de tubos
14 polínicos (Aizen & Feinsinger 1994), aumentando as taxas de intercruzamento e reduzindo a
15 variabilidade genética (Goverde *et al.* 2002), podendo levar inclusive a extinção de espécies
16 (Lennartsson 2002).

17 Sabe-se, entretanto, que as estratégias das plantas não se limitam apenas às interações com
18 seus polinizadores, pois espécies podem se reproduzir sem a presença de vetores, através de
19 estratégias de autofertilização, em que o pólen de uma mesma planta alcança seu estigma
20 viável, ou através da apomixia, em que o fruto é formado sem a fusão de gametas, com o
21 desenvolvimento do óvulo sem a recombinação de material genético. Muitas espécies
22 combinam mecanismos associados à reprodução por vetores e sem eles, sendo as chamadas
23 estratégias mistas de polinização (Kevan 1984, Goodwillie *et al.* 2005).

24 Em populações de plantas isoladas, as frequências de polinização devem diminuir tanto
25 pelas distâncias de forrageamento dos polinizadores, quanto pela atração destes que diminui

1 pelas manchas populacionais menores (Kunin 1993, Mustajärvi 2001). Por outro lado, nessas
2 espécies isoladas, com sistemas mistos de polinização, mecanismos de autofertilização são
3 registrados em maior frequência (Eriksen *et al.* 1993, Arroyo *et al.* 2006, Pérez *et al.* 2009).

4 Normalmente, a polinização cruzada, parece ser favorecida quando há a possibilidade
5 desta ocorrer. Diversos são os exemplos de estudos com espécies economicamente
6 importantes demonstrando um incremento da variabilidade genética pela polinização cruzada
7 que resulta em aumento na produção de frutos e sementes (estudos citados em Free 1993,
8 Maccagnani *et al.* 2003, Almeida *et al.* 2000) e/ou no maior vigor dos frutos (Alves & Freitas
9 2007, De Holanda-Neto *et al.* 2002, Nebel & Trump (1932). Em contraposição às vantagens
10 da polinização cruzada, a auto-polinização, pode reduzir a formação de sementes, produzir
11 sementes inviáveis (Torres & Galetto 2008) e levar a depressão genética (Mahy &
12 Jacquemart 1999, Cheptou *et al.* 2001).

13 No entanto, estudos têm revelado que em espécies com autogamia parcial ou completa o
14 polimorfismo pode ser mantido (Marshall & Weir 1979), e que espécies com longo histórico
15 de auto-cruzamentos parecem menos susceptíveis aos efeitos da depressão genética,
16 demonstrando adaptabilidade a tal condição (Charlesworth & Charlesworth 1987).

17 Já para plantas que se reproduzem por agamospermia, o polimorfismo genético não é
18 mantido (Marshall & Weir 1979) e em espécies endêmicas ou de distribuição restrita os
19 efeitos da baixa variabilidade genética parecem ser acentuados (Palacios & González-
20 Candelas 1997). Por outro lado, essa estratégia, pode garantir a reprodução eliminando a
21 dependência de polinizadores, aumentando também o potencial de colonização da espécie
22 vegetal (Baker 1955).

23 A ocorrência da polinização cruzada depende de diversos fatores como comportamento e
24 presença de polinizadores e das características estruturais das flores, como cor, recursos e
25 forma, que podem exercer pressões sobre as interações (Ellstrand & Elam 1993).

1 Caracteres como barreiras temporais e espaciais na maturação dos órgãos reprodutivos,
2 parecem auxiliar no favorecimento da polinização cruzada e por vezes no impedimento da
3 autofertilização, já que o depósito de pólen por auto-polinização pode ter custo negativo no
4 sucesso reprodutivo da espécie (Galen *et al.*1989). Contudo, não ocorrendo a polinização
5 cruzada as plantas têm o benefício da formação de sementes ou frutos que mesmo quando
6 possuem menor vigor garantem sua sobrevivência.

7 A existência de um sistema misto de polinização é, assim, uma importante estratégia,
8 mesmo em plantas especialistas, que apresentam neste sistema um produto de compensação
9 muitas vezes por pressões de um cenário evolutivo em ambientes caracterizados por
10 “serviços” de polinização variáveis, ou seja, habitats imprevisíveis (Pérez *et al.* 2009). Para
11 Darwin, a existência de flores com morfologias especializadas, como *Ophrys apifera*, que são
12 auto-fertilizadas, era um grande paradoxo já que seria esperado a ausência de autopolinização
13 espontânea em plantas especializadas, principalmente devido às restrições mecânicas e seu
14 tipo de desenvolvimento, como relatado em seu livro, publicado em 1862 (*The various*
15 *contrivances by which British and Foreign Orchids are Fertilized by Insects*).

16 Atualmente, mais exemplos são encontrados de plantas com morfologias elaboradas ou
17 ditas especializadas, como as orquídeas ou espécies da família Solanaceae, mas que devido às
18 condições ambientais adversas utilizam mecanismos de fertilização que não incluem
19 visitantes florais, embora em alguns casos, como das Solanaceae com anteras poricidas, a
20 taxa de autofertilização seja bastante baixa (Liu *et al.* 2006, Pérez *et al.* 2009). As mudanças,
21 ou as explicações para a adaptabilidade, mesmo quando aparentes, contudo, nem sempre são
22 simples, envolvendo em muitos casos questões históricas e evolutivas, associadas à ecologia e
23 à genética das espécies, que nem sempre podem ser acessadas.

24 Assim, questões relativas à aplicabilidade das síndromes de polinização, ao papel da
25 limitação de pólen e/ou polinizadores e ao efeito do isolamento de populações e interferência

1 nos sistemas reprodutivos são grandes paradigmas encontrados na literatura em ecologia da
2 polinização, cujos esforços para entendimento explicam-se na tentativa de entender as
3 relações dentro de diferentes escalas e possíveis rupturas das relações entre plantas e seus
4 polinizadores.

5 Diante disso, a espécie *Aristolochia gigantea* Mart e Zucc apresenta-se, aparentemente,
6 como excelente modelo para investigações de tais paradigmas nos tempos atuais. Esta espécie
7 pertence à família Aristolochiaceae, grupo de angiospermas basais, que compreende cerca de
8 500 espécies, a maioria (370 espécies) inclusas no gênero *Aristolochia* (Judd *et al.* 2009), de
9 distribuição primária em regiões tropicais, embora muitas espécies desse gênero também
10 sejam encontradas em ambientes temperados (Lawrence & González 2003). Países
11 particularmente ricos em espécies são México e Brasil que contêm inclusive muitas espécies
12 endêmicas ou de distribuição restrita (González 1998). As flores desta família chamam
13 atenção principalmente pelo seu grande tamanho, sendo consideradas as maiores do mundo,
14 juntamente com as flores de *Rafflesia* (Endress 1994) e também pela coloração conspícua
15 semelhante a cor de carne, normalmente uma coloração vermelha escura salpicada com
16 manchas brancas.

17 De maneira característica e bem conhecida as flores de *Aristolochia* são altamente
18 derivadas funcionando como armadilhas para insetos que realizam sua polinização (Knoll
19 1929 *apud* Rulík *et al.* 2008). Embora o gênero seja bastante diverso possui um plano básico
20 floral relativamente estável, formado por um perianto monossimétrico, de simetria zigomorfa
21 com apenas três sépalas unidas em um tubo longo, formando uma armadilha (Endress 1994).

22 Semelhante a ocorrência de um mesmo plano básico, a biologia floral das espécies parece
23 apresentar muitos aspectos em comum. Segundo Bello *et al.* (2006), o estudo da biologia
24 floral é registrado desde 1923 por Cammerloher, seguido pelos trabalhos de Petch (1924) e
25 Daumann (1959), demonstrando a ocorrência de forte protoginia.

1 Registros da biologia floral juntamente com os de polinização revelam que os insetos são
2 atraídos pela emissão de odores no lobo do perianto no primeiro dia de abertura das flores e
3 as papilas presentes, forçam o caminho para que os insetos não consigam sair e fiquem
4 aprisionados onde o néctar é secretado, no segundo dia onde não mais existe a produção de
5 odor, os estigmas se unem impossibilitando o recebimento de pólen e as anteras se abrem
6 liberando o pólen aos prisioneiros que são libertados (Proctor *et al.* 1996).

7 O odor nesta família tem papel importante na atração de polinizadores, sendo atribuído a
8 grande parte das espécies estudadas a presença de essências com odor desagradável,
9 semelhante à carne em putrefação (Endress 1994, Proctor *et al.* 1996). As espécies de
10 Aristolochiaceae têm uma forte relação de polinização com moscas saprófitas, que buscam as
11 flores para depositar seus ovos ou para encontrar um parceiro reprodutivo (Sakai 2002, Rulík
12 *et al.* 2008, Nakonechnaya *et al.* 2008).

13 A síndrome descrita para a família é a de sapromiofilia (Faegri & van der Pijil 1979)
14 corroborada aparentemente pela maior parte dos estudos realizados, sendo os dípteros os
15 visitantes predominantes, além de principais polinizadores, pela análise da carga polínica
16 (Costa & Hime 1981, Sakai 2002, Trujillo & Sérsic 2006, Nakonechnaya *et al.* 2008, Rulík *et*
17 *al.* 2008). Contudo, outros visitantes, mesmo que em menor número, são também reportados,
18 pertencentes às famílias Coleoptera, Hymenoptera, Psocoptera, Hemiptera, Neuroptera,
19 Thysanoptera, Lepidoptera (Costa & Hime 1981, Sakai 2002, Burgess *et al.* 2004, Rulík *et*
20 *al.* 2008).

21 A autopolinização dentro de uma mesma flor (autogamia) não ocorre nas flores desta
22 família, já que a protoginia ocorre. No entanto há registros tanto de espécies auto-
23 incompatíveis (Burgess *et al.* 2004) quanto de espécies auto-compatíveis (Trujillo & Sérsic
24 2006).

1 Para *Aristolochia gigantea*, estudos são escassos, o único trabalho publicado sobre a
2 biologia da polinização desta espécie foi realizado por Costa & Hime (1981) em planta
3 cultivada no Jardim Botânico do Rio de Janeiro, ou seja, fora do ambiente natural.

4 Previamente, no primeiro trabalho realizado com a espécie, na qual é feita sua descrição,
5 infere-se como habitat natural o estado da Bahia, embora sem maiores informações sobre
6 municípios e/ou locais (Martius & Zuccarini, 1824). Em trabalhos posteriores, confusões
7 sobre as informações quanto a sua origem e distribuição parecem começar a ocorrer, pois em
8 Barringer (1983) registra-se a ocorrência da planta para as florestas úmidas do Panamá e
9 Brasil Amazônico, embora esse autor registre diferenças no material da América Central e
10 América do Sul, sendo as flores deste último maiores. Já no trabalho de Masters (1869) a
11 origem da planta é atribuída a locais “em montanhas” na Bahia e Minas Gerais. Trabalhos
12 posteriores citam a origem da espécie apenas na Bahia (Bellair & Saint-Léger 1899) e na
13 Bahia e em Minas Gerais (Rodigas 1893, Costa & Hime 1981, Capellari-Junior 1991).

14 Segundo Capellari-Junior (1991) esta espécie ocorre em regiões do bioma caatinga, porém
15 preferencialmente em áreas úmidas como margens de rios, matas secundárias, pastagens e
16 bordas de estradas, e quando cultivada, desenvolve-se bem em qualquer tipo de solo. Talvez
17 por isso haja certa confusão no registro de algumas espécies, como por exemplo, da espécie
18 reportada por Barringer (1983) que deve ser cultivada na Amazônia (Capellari-Junior 1991).
19 Registros de espécies são encontrados em herbários no Brasil como nos estados de São Paulo,
20 Rio de Janeiro, Santa Catarina, Paraná, e fora do país na Costa Rica, Panamá e Estados
21 Unidos, embora tais registros sejam atribuídos a espécies cultivadas (Costa & Hime 1981,
22 Capellari-Junior 1991).

23 A contradição nas informações mostra a necessidade de estudos que visem esclarecer a
24 distribuição e origem de *Aristolochia gigantea*. Uma importante e útil ferramenta para
25 analisar os padrões de distribuição geográfica é a modelagem ecológica de distribuição de

1 nicho. Nesta abordagem, um modelo de nicho ecológico é construído, baseado nos valores de
2 variáveis ambientais (dimensões do nicho) de localidades conhecidas e projetado em um
3 espaço geográfico para a identificação de regiões potenciais para a ocorrência das espécies
4 (Scott *et al.*2002). A aplicação desta técnica é bastante útil em caracterizar distribuições
5 geográficas baseadas em conjuntos de dados muitas vezes incompletos, como em espécies
6 não estudadas e que podem apresentar erros quanto a sua distribuição (Siqueira *et al.* 2009).

7 Complementarmente a confusão na distribuição, o odor em *Aristolochia gigantea* não
8 parece algo bem estabelecido. Capellari-Junior (1991) reportou diferenças nos registros de
9 herbários encontrados referentes ao odor das espécies, pois em notas de plantas na região de
10 origem (áreas de caatinga) as flores desta espécie apresentam odor de carne em putrefação,
11 mas quando cultivadas em São Paulo as flores apresentavam odor semelhante à erva-cidreira.
12 O estudo de Costa & Hime (1981) com a espécie, embora tenha focado apenas em
13 características das flores como morfologia, pigmentos e polinizadores, sem tratar do sistema
14 reprodutivo da espécie registraram seu odor como forte e adocicado, semelhante a frutas em
15 decomposição, mas sem chegar a ser tão desagradável.

16 Poderíamos esperar assim por algumas informações contrastantes que ou há mais de uma
17 espécie dita como *Aristolochia gigantea*, ou variações podem ocorrer naturalmente na
18 espécie, inclusive no seu odor. Observações prévias realizadas em campo por P.G. Kevan, B.
19 F. Viana e F. O. da Silva, na Bahia, apontaram a existência de odor de citronela nas flores e
20 nenhum visitante floral foi encontrado. Os odores desta espécie são uma mistura bastante
21 complexa, aparentemente o odor de carne em putrefação pode ocorrer dentro do utrículo, mas
22 o odor de citronela é encontrado no perianto (Robert Raguso *pers. com.*).

23 Seria esperada então, pelo odor de putrefação (não foi observado *in situ*), a atração por
24 dípteros saprófitos, mas o odor de citronela é associado normalmente como repelente de
25 moscas. Outros visitantes, como as abelhas euglossíneas (Euglossine, Hymenoptera, Apidae)

1 podem ser atraídas por citronela (Dodson *et al.* 1969, Pearson & Dressler 1985), mas
2 poderíamos também esperar encontrar outros dípteros não saprófitos (Howlett 1912 *apud*
3 Jang *et al.* 1997).

4 A distância entre os indivíduos de *A. gigantea* pode também ser crucial para identificar
5 padrões relacionados à disponibilidade de polinizadores e as estratégias reprodutivas da
6 planta, ou seja, se as espécies estiverem isoladas o bastante para impedir o deslocamento dos
7 polinizadores elas podem estar com altas taxas de autofertilização. Todavia, para acessar a
8 maior parte da variabilidade existente da espécie, além do uso de ferramentas ecológicas, é
9 fundamental o uso de ferramentas genéticas, por proporcionarem mais elementos para análise
10 da estrutura populacional.

11 O uso da genética em trabalhos de ecologia da polinização permite que elementos da
12 história das espécies possam ser reconstruídos, unindo aspectos evolutivos e de mudanças dos
13 grupos de polinizadores ou estratégias de polinização (Reddy *et al.* 2002, Pérez *et al.* 2006,
14 Pérez *et al.* 2009), além disso, estratégias de conservação podem ser suplementadas (Crema *et*
15 *al.* 2009).

16 Diante das questões levantadas, da ausência de estudos em ambientes naturais com
17 *Aristolochia gigantea* e principalmente pela possibilidade da relação desta espécie com uma
18 possível mudança na síndrome de polinização prevista, provavelmente por pressões
19 ambientais como a limitação nos “serviços” de polinização, a presente dissertação tem como
20 objetivo principal prover melhor entendimento da diversidade de mecanismos de polinização
21 e distribuição geográfica no gênero *Aristolochia* e nas angiospermas basais em geral. Assim,
22 no primeiro capítulo iremos apresentar os resultados das investigações relacionadas ao
23 sistema de polinização de *A. gigantea* e no segundo o modelo preditivo da distribuição dessa
24 espécie baseada nas características do seu nicho.

25

Artigo 1

Type of article: ORIGINAL ARTICLE

**Biologia da Polinização e variabilidade genética de uma flor gigante
perfumada (*Aristolochia gigantea* Mart & Zucc – Aristolochiaceae) visitada
principalmente por pequenos Diptera**

**Juliana Hipólito de Sousa*¹, Blandina Felipe Viana¹, Alessandra Selbach
Schnadelbach², Leonardo Galetto³, Peter G. Kevan⁴**

¹*Laboratório de Biologia e Ecologia de Abelhas, Instituto de Biologia, Universidade
Federal da Bahia, Salvador, Brazil, 40.170-110,* ²*Laboratório de Biologia Molecular,
Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil,* ³*Universidad
Nacional de Córdoba, IMBIV (UNC – CONICET), CC 495, 5000, Córdoba,
Argentina,* ⁴*Department of Environmental Biology, University of Guelph, Guelph,
Ontario N1G 2W1, Canada*

A ser submetido para:

Periódico: **Annals of Botany ISSN 0305-7364**

As normas do periódico estão apresentadas no anexo

1 ABSTRACT

2

3 • *Background and Aims* *Aristolochia* genus presents a basic structural plan of trap flowers and
4 a fly pollination syndrome in a very conserved way. The flower scents in this family play an
5 important role in the attraction, being common human unpleasant smells. The
6 exception to this was reported in only one species until now, *Aristolochia gigantea*,
7 which has citronella-like odor. This trait may indicate a differentiation in the flower visitors
8 with respect to the usual visitor fauna reported for other species of *Aristolochia*.
9 Characteristics and behavior of pollinators coupled with the
10 distance between individuals and populations can be crucial to identify patterns on the genetic
11 structure that can be linked to both the availability of pollinators and plant reproductive
12 strategies. Thus, we analyzed the reproductive success, pollinators, genetic flow and
13 conservation status of *A. gigantea* populations in the Chapada Diamantina, Bahia.

14 • *Methods* Fifteen populations of *A. gigantea* were used in this study to tests about floral
15 biology, resource, pollination systems, in controlled experiments (open and bagged flowers)
16 and visitors collected in flowers. To genetic variability six populations were selected in
17 different places, and analysed with a PCR-ISSR technique.

18 • *Key Results and Conclusion* As usual in the genus, fly pollination was observed in this
19 species even with particularities as flower size and odor. The main pollinator of this species
20 seems to be *Megaselia* (Phoridae), evidenced primarily by its frequency within flowers and
21 the transference of compatible pollen tubes. Considering *A. gigantea* dependent on biotic
22 vectors for seed formation, the small size of plant populations and the limited flight range of
23 pollinators may be directly related to the low genetic variability suggesting also pollen
24 limitation and a need of conservation practices that address not only the species, but the
25 native pollinator's populations.

26 **Key words:** Aristolochiaceae, *Aristolochia gigantea*, floral biology, pollination, flower
27 visitors, specialization, Diptera, genetic variability.

28 **Palavras-chaves:** Aristolochiaceae, *Aristolochia gigantea*, biologia floral, polinização,
29 visitantes florais, especialização, Diptera, variabilidade genética.

30

31

32

33

INTRODUÇÃO

A literatura clássica em ecologia da polinização se baseia no paradigma de que diversos fenótipos florais refletem a especialização em diferentes grupos de polinizadores, as chamadas síndromes de polinização (Faegri & van der Pijil, 1979; Fenster *et al.*, 2004). Atualmente, trabalhos demonstram que embora as síndromes sejam bons guias que provêm uma idéia inicial sobre a ecologia da polinização da planta, elas não devem ser utilizadas exclusivamente para desenhar conclusões sem estudos empíricos, pois as interações entre plantas e polinizadores são amplamente diversas para serem resumidas em alguns poucos termos, como características fenotípicas das espécies (Ollerton & Watts, 2000).

Além da atração por recursos oferecidos pelas plantas, a presença de polinizadores e a flutuação destes nas comunidades são, muitas vezes, influenciadas pelo ambiente físico, que age como filtro das comunidades (Sargent & Ackerly, 2008). A composição e a interação da fauna visitante também pode ser reflexo do contexto da paisagem na qual a população está inserida (Steffan-Dewenter *et al.*, 2002; Devoto *et al.*, 2005), revelando interações mais ou menos especializadas (Warren *et al.*, 1988; Kearns, 1992; Torres *et al.*, 2007).

A especialização de uma planta a determinado grupo de polinizador, pode aumentar o seu sucesso reprodutivo, pois normalmente implica em uma menor perda de pólen (Dafni, 1984; Wilcock & Neiland, 2002). Por outro lado, morfologias florais mais especializadas, estariam mais sujeitas às variações nos “serviços” de polinização (Waser *et al.*, 1996), ou seja, o seu sucesso reprodutivo correria maior risco decorrente da falha do transporte de pólen pela falta de vetores especializados (Wilcock & Neiland, 2002).

1 Além da especialização em um determinado grupo, sistemas de compatibilidade e
2 incompatibilidade têm diferentes pesos no sucesso reprodutivo das plantas. A auto-
3 incompatibilidade parece ser uma estratégia favorável pelo incremento da variabilidade, ou
4 mesmo por evitar a depressão genética (Mahy & Jacquemart, 1999; Cheptou *et al.*, 2001), por
5 outro lado, a auto-compatibilidade pode garantir a formação de frutos e consequente
6 perpetuação da espécie em locais de condições extremas (Pérez *et al.*, 2009), ou em locais em
7 que polinizadores são ausentes (Barrett *et al.*, 1989).

8 Fatores morfológicos, tróficos, e também ambientais podem influenciar essas relações
9 (Boggs, 1988; Herrera, 1995; Torres *et al.*, 2007; Sargent & Ackerly, 2008; Andrieu *et al.*,
10 2009), por isso, tais interações e suas relações de especialização consistem em bons
11 elementos para testar muitas hipóteses atuais envolvidas com processos ecológicos e
12 evolutivos (Real, 1983), podendo prover entendimento para adaptações ecológicas entre
13 espécies. Espécies ou famílias com maior grau de especialização, contudo, parecem constituir
14 modelos mais interessantes para entendimento das síndromes, por facilitarem a visualização e
15 entendimento de mudanças ocorrentes nos grupos de polinizadores, ou mesmo no sistema
16 sexual (Pérez *et al.*, 2006; Patterson & Givnish, 2003; Johnson *et al.*, 2008; Smith, 2010;
17 Pauw, 2006).

18 Aristolochiaceae é uma família basal de Angiospermas, de distribuição primária em
19 regiões tropicais (Lawrence & González, 2003) e com a maior parte das espécies (c.a. 370)
20 pertencentes ao gênero *Aristolochia* (Judd *et al.*, 2009). O plano estrutural básico das flores é
21 relativamente constante no grupo, embora haja enormes variações do tamanho floral (por
22 exemplo, menos de 2.0 cm como em *Aristolochia reticulata* e *A. serpentaria* a mais de 35 cm
23 como em *A. grandiflora* e *A. gigantea*). De maneira característica e bem conhecida as flores
24 de *Aristolochia* apresentam muitos aspectos morfológicos em comum entre si, como o fato de
25 se apresentarem como armadilhas para insetos que realizam sua polinização (Knoll, 1929

1 *apud* Rulík *et al.*, 2008), com uma estrutura floral relativamente estável, formado por um
2 perianto monossimétrico, de simetria zigomorfa com apenas três sépalas unidas em um tubo
3 longo, formando uma armadilha (Endress, 1994), e uma biologia floral com aspectos bastante
4 conservadores, em que há a atração de insetos pela emissão de odores no lobo do perianto no
5 primeiro dia de abertura das flores e a liberação dos polinizadores prisioneiros apenas no
6 segundo dia (Proctor *et al.*, 1996).

7 O odor nesta família tem papel importante na atração, sendo atribuído a grande parte das
8 espécies estudadas a presença de essências com odor desagradável, semelhante a carne em
9 putrefação (Endress, 1994; Proctor *et al.*, 1996). Há nesta família uma forte relação de
10 polinização com moscas saprófitas que buscam as flores para depositar seus ovos ou para
11 encontrar um parceiro reprodutivo (Sakai, 2002; Rulík *et al.*, 2008; Nakonechnaya *et al.*,
12 2008). Aparentemente, a relação com os visitantes florais é forte, pois a autogamia não deve
13 ocorrer nessas plantas, devido a forte dicogamia (protoginia). Quanto a biologia reprodutiva,
14 há tanto espécies auto-incompatíveis (Burgess *et al.*, 2004) quanto auto-compatíveis (Trujillo
15 & Sérsic, 2006).

16 Para *Aristolochia gigantea* os estudos são escassos, a única referência encontrada na
17 literatura sobre a biologia da polinização desta espécie é a de Costa & Hime (1981), com
18 estudos realizados em plantas cultivadas no Jardim Botânico do Rio de Janeiro, ou seja, fora
19 do ambiente natural. Observações prévias realizadas por P Kevan, B. Viana e F.O. da Silva,
20 em ambiente natural, na região da Chapada Diamantina, no Estado da Bahia, chamaram
21 atenção inicialmente para um odor bastante semelhante a citronela, que seria bastante
22 diferente do esperado para o arquétipo desta família. Assim, por caracteres morfológicos que
23 se mantêm, seria esperada uma polinização por dípteros saprófitos, mas o odor de citronela,
24 geralmente associado como repelente de moscas, poderia ocasionar o aparecimento de outros
25 grupos de polinizadores, como abelhas euglossíneas (Euglossine, Hymenoptera, Apidae)

1 (Dodson *et al.*, 1969; Pearson & Dressler, 1985), ou mesmo outros dípteros não saprófitos
2 (Howlett, 1912 *apud* Jang *et al.*, 1997).

3 Mudanças na fauna visitante podem acarretar em modificações no fluxo gênico da espécie
4 de planta (Schmitt, 1980). Aliada a uma possível mudança na síndrome de polinização de *A.*
5 *gigantea*, a distância entre os indivíduos e populações podem ser cruciais para identificar
6 padrões relacionados à disponibilidade de polinizadores e às estratégias reprodutivas da
7 planta. Assim, o conhecimento da estrutura genética de uma população pode complementar
8 informações sobre a polinização, sistema reprodutivo, dispersão, dentre outros aspectos da
9 ecologia da planta já que tais fatores estão extremamente relacionados (Loveless & Hamrick,
10 1984).

11 Diante dessas observações, a espécie *A. gigantea* seria, aparentemente, um excelente
12 modelo para respostas de questões referentes ao paradigma das síndromes de polinização nos
13 tempos atuais, já que se apresenta como um dos extremos do gradiente de variação de
14 tamanho floral com flores com mais de 35 cm, e com odor diferente das demais estudadas até
15 o presente momento.

16 Assim, pretende-se prover melhor entendimento sobre a ecologia da polinização de *A.*
17 *gigantea* acrescentando informações para o gênero e angiospermas basais em geral,
18 analisando o fluxo gênico, o sucesso reprodutivo e o status de conservação da espécie. Os
19 objetivos específicos foram formulados para responder as seguintes perguntas: Quem são os
20 potenciais polinizadores de *A. gigantea*? A espécie depende de vetores para a formação de
21 frutos? Qual a taxa de formação de tubos polínicos com diferentes grupos de visitantes e em
22 flores sem manipulações experimentais? Qual a proporção de diversidade genética entre
23 populações e estruturação genética? O que a estrutura genética populacional sugere quanto ao
24 seu padrão de polinização?

25

MATERIAL E MÉTODOS

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

Área de estudo

A partir de registros de herbários foram realizadas buscas de locais com populações de *A. gigantea*, para estudos manipulativos na Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. Quinze populações foram encontradas (Tabela 1, Fig. 1) em cinco municípios, sendo eles Morro do Chapéu, Utinga, Lençóis, Itaetê e Rio de Contas. Os locais em que as populações se encontram partilham algumas características em comum como: estarem presentes em vegetações sempre próximas a corpos d'água, perenes ou não; geralmente ocupando áreas restritas (isoladas), não ocupando, por exemplo, manchas contínuas na paisagem.

As observações foram realizadas durante o ano de 2010 com visitas mensais em diferentes localidades, durante as visitas eram registradas informações quanto a presença de flores e sementes nas populações. Todas as populações foram utilizadas para a coleta de flores e insetos nas flores assim como de observações quanto a floração, contudo, para as observações da biologia floral e sistemas reprodutivos, foram utilizadas apenas as populações presentes da região de Rio de Contas.

Procedimentos amostrais:

Identificação dos principais polinizadores de A. gigantea?

Para responder a esta pergunta, foram feitos testes primeiramente para descrever características importantes para a polinização da espécie, como referentes a sua biologia e recursos florais e da coleta de visitantes em flores.

Biologia floral

Durante os meses de maio e junho, flores de *A. gigantea* (n = 15) de diferentes plantas foram marcadas na fase de botão (em pré-antese) e seu desenvolvimento foi observado

1 durante todo o ciclo de vida, até o envelhecimento (senescência), registrando-se o momento
2 da ocorrência das diferentes fases do seu desenvolvimento, referentes à mudança dos
3 apêndices florais, órgãos reprodutivos e odores. Para complementar informações sobre
4 características da espécie, 13 flores foram mensuradas em relação ao comprimento total,
5 largura total, tamanho do utrículo e largura do utrículo.

6 A receptividade estigmática foi testada, com uso de peróxido de hidrogênio como descrito
7 por Dafni *et al.* (2005), em três flores diferentes por fenofase (n= 3 para cada estágio floral,
8 fase feminina, fase intermediária e fase masculina), observando-se a presença ou não de
9 bolhas produzidas pela reação. A viabilidade polínica foi avaliada com vermelho neutro 1%
10 segundo Kearns & Inouye (2003), em anteras não deiscentes de flores abertas (n=5) até
11 anteras deiscentes em fenofase masculina (n=5) e anteras de flores senescentes (n=5).
12 Sementes foram contabilizadas em frutos formados naturalmente nas populações (n= 19).

13 Grãos de pólen foram montados em stubs metálicos (porta-espécime), metalizados com
14 ouro e observados em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-6390 LV a 10 kV.

15

16 *Recurso floral*

17 O néctar foi removido em três flores recém abertas logo no primeiro dia de abertura da
18 flor, com auxílio de papel filtro Wathman no. 1 para acessar a composição de açúcares. A
19 identificação e a quantificação de carboidratos foram realizadas através de cromatografia
20 gasosa. As amostras foram processadas com trimetilclorosilano e hexametildisilano em
21 pirimidina (Sweeley *et al.*, 1963). Em seguida os derivados foram injetados em um
22 cromatógrafo gasoso Konik 3000-HRGS equipado com um integrador Spectra – Physics
23 SP4290 e um detector de ionização de chama e uma coluna OV 101 (2m de altura), 3% sobre
24 Chromosorb G/AW- DMCS (malha 100 – 120). Foi utilizado nitrogênio como gás portador
25 (30 ml/min) e o seguinte programa de temperatura: temperatura inicial 208°C /2min, logo 1°C

1 /min até os 215°C que se manteve por 1 min, por fim 8°C /min até 280°C no qual se
2 estabilizou durante 5 min (Galletto & Bernadello 2005). Os açúcares-testemunha (Sigma
3 Chemical C.) foram processados do mesmo modo.

4

5 *Visitantes florais*

6 Flores abertas em diferentes estágios foram coletadas e observadas quanto a presença de
7 visitantes florais em seu interior (n=137, mesmo grupo de flores em que visualizou-se a
8 formação de tubos polínicos). As flores coletadas tinham sua abertura fechada para impedir a
9 saída dos visitantes e posteriormente eram colocadas em congelador para separação destes
10 que foram alfinetados ou fixados em álcool a 70% dependendo do tamanho e grupo
11 taxonômico para posterior identificação e examinados quanto a presença de grãos de pólen
12 aderidos ao corpo. Também foi registrada a fase das flores em que se encontravam.

13 Durante o período de observação da biologia floral, no mês de maio, duas flores foram
14 observadas também quanto ao comportamento de visitantes florais em visitas às flores, sendo
15 registrado o período em que entravam em flores recém-abertas, ou saíam de flores do segundo
16 dia, assim como seu comportamento em flores no segundo dia, antes de saírem, através da
17 abertura do utrículo com auxílio de estilete. O comportamento foi registrado através de
18 filmagens em um período aproximado de 24 horas de observações.

19

20 *Análise da dependência de vetores para produção de frutos e sementes*

21 Para saber se as flores de *A. gigantea* eram autogâmicas, flores foram isoladas de visitantes
22 florais antes da antese e observadas quanto à formação ou não de frutos (n=17), sendo ao
23 mesmo tempo comparadas com flores marcadas, mas não ensacadas (n=17), após cerca de
24 quinze dias, tempo necessário para a visualização do intumescimento da região do ovário,
25 eram registradas informações de formação ou não de frutos.

1 Outros experimentos como a geitonogamia e a xenogamia não foram realizados devido às
2 dificuldades encontradas, como o pequeno número de flores disponíveis para a realização dos
3 experimentos e a imprevisibilidade no tempo de duração de cada fenofase floral; na maioria
4 das vezes não era possível prever quando um botão floral, mesmo com grande tamanho,
5 estava prestes a abrir.

6

7 *Avaliação da taxa de formação de tubos polínicos com diferentes grupos de visitantes e*
8 *em flores sem manipulações experimentais*

9 Estigmas florais de diferentes estágios foram coletados e processados com corante azul de
10 anilina (Martin, 1959; Dafni *et al.*, 2005) para observação em microscópio de fluorescência,
11 em busca de tubos polínicos formados em flores em que não encontramos visitantes (n= 103)
12 e em flores em que podemos encontrar visitantes de diferentes grupos taxonômicos (n= 137,
13 flores que foram coletadas com diferentes grupos de visitantes identificados até o nível mais
14 específico possível por especialistas). A identificação dos diferentes grupos, seu número e
15 quantidade nas flores, relacionada com a formação de tubos polínicos nos provê mais
16 precisão para inferir o potencial polinizador desta espécie.

17

18 *Análise da diversidade e estrutura genética de populações*

19 Para a realização de análises genéticas, que podem sugerir o padrão de polinização da
20 população, foram selecionadas seis populações, em diferentes localidades, correspondendo a
21 65 indivíduos, com uma média aproximada de 11 indivíduos por população (Tabela 1). Por
22 ser uma espécie de trepadeira e de difícil determinação de indivíduos, foram considerados
23 como indivíduos plantas jovens, com distinção bastante clara de onde estavam e para os
24 indivíduos mais velhos, realizamos estimativas com base na área e plantas com caules

1 bastante evidentes, preferindo nestas contabilizar um número menor de indivíduos para não
2 superestimar o número na população.

3 Foram coletadas amostras de folhas de cada indivíduo e acondicionadas em sílica gel para
4 desidratação e posterior extração de DNA. Após a desidratação das amostras, as mesmas
5 foram processadas no Laboratório de Biologia Molecular (LBM) da Universidade Federal da
6 Bahia.

7 O DNA de cada amostra foi extraído de folhas conforme protocolo adaptado por Doyle &
8 Doyle (1987) que utiliza tampão de extração CTAB 1% e purificação com
9 clorofórmio:octanol (24:1), adaptado para microtubos. O DNA extraído foi quantificado
10 através de eletroforese em gel de agarose 1% com tampão TAE (Tris, Ácido Acético, EDTA)
11 corado com brometo de etídio na presença de marcador Lambda Hind III.

12 O DNA genômico total foi usado para amplificação através da reação em cadeia da
13 polimerase (Polymerase Chain Reaction - PCR). A amplificação de todos os fragmentos foi
14 realizada em um volume final de 20 µl contendo 1X buffer, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs,
15 0.5 mM de *primer*, 1.0 unidade de *Taq* DNA polymerase (Phoneutria) e DNA genômico. A
16 amplificação dos fragmentos iniciou com um ciclo de desnaturação inicial de 94°C por 1 min
17 e 30 seg, seguido de 35 ciclos de amplificação de 94°C por 40 seg (desnaturação), 46°C por
18 45 seg (anelamento), 72°C por 1 min 30 seg (extensão), e após um ciclo final de 94°C por 45
19 seg, 44°C por 45 seg, e 72°C por 7 min. Foram utilizados os *primers* UBC899, John, Terry,
20 Mao e Manny para a amplificação de regiões ISSR (Wolfe *et al.*, 1998). Os produtos da
21 reação de PCR foram separados e visualizados através da eletroforese em gel de agarose 1,4%
22 com tampão TAE corado com brometo de etídio na presença de marcador *Ladder* de 100
23 pares de bases e posteriormente foram fotodocumentados.

24 O perfil genético de todos os indivíduos de cada população para cada *primer* utilizado foi
25 determinado através da análise comparativa das imagens dos géis de cada população. Este

1 perfil foi convertido em uma matriz de presença (1) e ausência (0) de bandas utilizadas para
2 as análises genéticas, comparando as bandas com as bandas do marcador presente no gel. A
3 variabilidade genética para todas as populações foi estimada pelos seguintes parâmetros:
4 número de bandas, número de bandas exclusivas, proporção de loci polimórficos (P ; critério
5 0,95), heterozigosidade média esperada (H_e ; Lynch & Milligan, 1994; Powell *et al.*, 1996).
6 Matrizes de distância genética e de identidade genética ("unbiased genetic identity"; Nei,
7 1978) foram calculadas para populações, e também foi realizada a Análise Molecular de
8 Variância (AMOVA) através do software GenAlex 6.2 (Peakall & Smouse, 2006). A partir
9 das distâncias genéticas de Nei (1978) obtidas pelo GenAlex foram realizadas análises de
10 agrupamento "*Ward method*" do programa Past (Hammer *et al.*, 2001).

11 A estimativa da proporção da diversidade genética entre populações (Gst) (Pearse &
12 Crandall, 2004), importante para avaliar a estrutura populacional, bem como, do fluxo gênico
13 (Nm) foram calculadas a partir das frequências alélicas segundo Lynch & Milligan (1994)
14 através do Software Popgene 1.31 (Yeh *et al.*, 1999). Os dados de fluxo gênico foram
15 corrigidos indiretamente através da fórmula $Nm = 0.5 (1-Gst/Gst)$ (McDermott & McDonald,
16 1993) pelo fato de ISSR ser um marcador dominante.

17

18

RESULTADOS

19

20 *A. gigantea* é uma liana perene de floração assincrônica nas populações, e de caule
21 bastante fibroso e resistente (Fig. 2-B). Suas flores possuem em média 33 ± 4 cm de
22 comprimento total, mas algumas podem ultrapassar 50 cm. A coloração das sépalas, bastante
23 conspícua, possui tom avermelhado, quase vinho com manchas pequenas brancas presentes
24 em toda sua extensão, possuindo próximo a abertura do utrículo (com média 20 cm de

1 comprimento e abertura com 6 cm de largura) uma coloração amarelada que se estende por
2 cerca de 3 cm acima deste (Fig. 2-A).

3 Tipicamente, como característica da família, esta espécie possui as estruturas femininas e
4 masculinas (seis estigmas e seis anteras) fusionadas formando uma só estrutura denominada
5 ginostêmio (Fig.3-D). O fruto é uma capsula septícida, pêndulo, formado a partir da
6 fecundação do ovário ínfero que quando não fecundado se assemelha a um filamento preso às
7 sépalas (Fig. 2-C), quando fecundado forma um fruto com abertura a partir da base, abrigando
8 diversas sementes com pequena ala em torno da estrutura germinativa de formato cordiforme
9 (Fig. 2-D).

10 Durante o período de estudo, as flores de *A. gigantea* iniciaram a abertura de 0000 h até
11 5000 h, contudo, a maioria das flores inicia a antese às 3000 h. As condições climáticas não
12 variaram muito no período com mínima de 13°C entre 2000 h e 3000 h e máxima de 23°C às
13 8000 h.

14 A separação total das sépalas pode levar de poucos segundos até algumas horas (o maior
15 tempo registrado foi de quatro horas) estando neste momento os estigmas já receptivos e as
16 flores assim no estágio feminino (Fig. 3-C). No momento da abertura é difícil a percepção de
17 algum odor, mas entre 6000 h a 8000 h, dependendo das condições climáticas, por exemplo,
18 da temperatura mais alta ou do aparecimento do nascer do sol mais cedo, as flores começam a
19 exalar um forte odor, semelhante a citronela que normalmente permanece mesmo após ser
20 fecundada, até cerca de quatro dias após a abertura das flores.

21 No segundo dia da abertura, aproximadamente 22 horas após a antese, os estigmas
22 colapsam, retraindo a parte superior (Fig. 3-D), a partir deste momento cessa a receptividade,
23 as flores ficam em um estágio intermediário sem a receptividade estigmática e também ainda
24 sem a deiscência das anteras que ocorre cerca de cinco horas depois ou de 27 horas após a
25 antese com a exposição dos grãos de pólen e mudança para o estágio masculino (Fig. 3-E).

1 Finalmente após 48 horas do início da antese, ocorrem mudanças na coloração das anteras,
2 que se tornam mais escuras. Mesmo neste estágio final, muitas flores permanecem com as
3 pétalas bastante vistosas e o odor pode permanecer por até quatro ou cinco dias, após esse
4 período a parte superior das sépalas caem e as flores ficam bastante escuras até caírem. Caso
5 haja a fecundação, o ovário, localizado acima das sépalas começa a “inflar”, essa mudança
6 pode ser facilmente percebida após aproximadamente quinze dias. Com a formação final do
7 fruto do tipo cápsula septicida, pêndulo cuja abertura ocorre a partir da base, abrigando
8 aproximadamente 718 ± 294 sementes que possuem pequena ala em torno da estrutura
9 germinativa de formato cordiforme (Fig. 2-C,D). Estas sementes estão dispostas em seis
10 lóculos, com uma média de 120 sementes por lóculo.

11 Os grãos de pólen de *A. gigantea* têm aproximadamente 50 μm , são apolar-assimétricos,
12 inaperturados de sexina verrucada e estão viáveis mesmo em anteras fechadas, mas são
13 liberados apenas após o segundo dia de abertura, não ocorrendo desta forma sobreposição de
14 fenofases. Contudo, no mesmo indivíduo é possível encontrar flores em diferentes estágios
15 florais, ou seja, flores em botão, em fase masculina e fase feminina, não excluindo assim a
16 possibilidade da ocorrência de geitonogamia.

17 O néctar pode ser obtido em flores recém abertas, no estágio feminino. Nas flores mais
18 velhas, do segundo dia, mesmo quando são isoladas de visitas por sacos de voil ou plástico,
19 não é possível a retirada do recurso. A composição do néctar consiste em sua maior fração de
20 sacarose (56.5 a 68.81%) seguida por frutose (19.53 a 29.73%) e glicose (11.66 a 14.25%), e
21 está presente na forma de pêlos glandulares em duas pequenas porções de forma circular
22 quase centrais na porção interna do utrículo (Fig. 3-F). A visualização destas regiões é mais
23 difícil no início da abertura, pois sua estrutura se confunde com os demais tricomas do
24 utrículo; apenas no segundo dia após a antese, ou quando o papel filtro era utilizado para
25 remover o néctar era possível observar um escurecimento da região. Provavelmente o uso do

1 néctar pelos visitantes ou mesmo o simples fato de caminharem pelas flores podem escurecer
2 as áreas dos nectários.

3 Das 137 flores de *A. gigantea* coletadas com visitantes florais foram encontrados 1430
4 visitantes pertencentes a diferentes ordens como: Diptera, Coleoptera, Hemiptera,
5 Hymenoptera e Araneae. Destes representantes da ordem Diptera estiveram em mais de 80%
6 das flores coletadas, sendo a família Phoridae a mais representativa (Tabela 2).

7 Nas flores em que os visitantes florais estavam presentes, ocorreu a formação de grandes
8 quantidades de tubos polínicos em 23% das flores apenas. Em 16% das flores foi encontrada
9 uma quantidade de até 50 tubos polínicos e em 61% das flores não houve a formação de um
10 tubo polínico sequer. Das flores com formação de grande quantidade de tubos polínicos pode-
11 se notar que a quantidade de visitantes no interior variou bastante, de um a quase duzentos,
12 mas na maioria das flores indivíduos da família Phoridae estavam presentes, as exceções
13 foram para uma flor contendo um indivíduo de *Zaprionus indianus* (Drosophilidae) e uma
14 contendo um indivíduo da família Chironomidae.

15 Dentre as espécies de Phoridae nas flores com presença de muitos tubos polínicos, estavam
16 espécies de: *Pseudohypocera* sp. (Fig. 5-A), *Neodohrniphora* sp. e *Megaselia* sp. (Fig. 5-B).
17 A espécie *Megaselia* sp. esteve presente em quase todas essas flores, com exceção apenas
18 daquelas em que foram encontrados visitantes de outras famílias, citadas anteriormente e
19 também ocorreu exclusivamente em 21 destas flores.

20 A quantidade de insetos nas flores com formação de tubos polínicos de maneira geral foi
21 muito baixa, havendo normalmente um a dois indivíduos de cada espécie, a exceção ocorre
22 novamente para a espécie *Megaselia* sp., com registro de até 165 indivíduos nas flores.
23 Embora esta espécie, também tenha sido encontrada em 32% das flores sem a formação de
24 tubos polínicos com um a onze indivíduos por flor.

1 Normalmente, não são encontrados muitos indivíduos nas flores, pois de todas as flores
2 analisadas, apenas três apresentaram mais de 70 indivíduos na flor. De maneira geral, as
3 flores apresentaram uma média de 12 visitantes por flor, com número máximo de 187
4 visitantes e mínimo de um, em muitas flores (54) foram encontrados apenas um ou dois
5 visitantes.

6 Durante o período de 24 horas de registro dos visitantes nas flores encontramos apenas
7 indivíduos da família Phoridae, provavelmente pelo fato de ser esta a mais comum nas flores.
8 A entrada destes insetos nas flores ocorreu normalmente pela manhã com o nascer do sol e da
9 emissão de odores, sendo observada a entrada de indivíduos entre 6300 h a 6500 h até as
10 8000 h. Normalmente sua saída das flores de segundo dia ocorre também neste horário e
11 muitos indivíduos foram observados se deslocando para flores próximas, na mesma planta,
12 alguns com grãos de pólen aderidos ao corpo.

13 Antes de deixarem as flores, indivíduos da família Phoridae foram observados caminhando
14 sobre o ginostêmio em busca de pólen e ficaram por mais de uma hora se alimentando de
15 grãos de pólen mesmo com os danos realizados nas flores para a observação. O único grupo
16 encontrado com grandes quantidades de pólen aderido ao corpo, na parte dorsal do tórax
17 foram insetos da família Phoridae, mais especificamente espécies de *Pseudohypocera* sp. e
18 *Megaselia* sp., também foi observado que tais insetos podem sair facilmente das flores
19 mesmo no primeiro dia.

20 Quanto à formação de frutos notou-se que flores isoladas de visitantes florais não
21 produzem frutos, e entre as flores expostas aos visitantes há uma taxa de formação de frutos
22 de aproximadamente 40%. Das flores que foram observadas quanto a formação de tubos
23 polínicos, notou-se que em apenas 21% destas havia grande quantidade de formação de tubos
24 polínicos, a visualização destas lâminas não permite a contagem da quantidade exata de tubos
25 formados, apenas de grandes massas com grãos de pólen e tubos polínicos entrelaçados,

1 diferentemente dos 25% dos estigmas observados em que a máxima quantidade de tubos
2 existente foi de até 70 tubos polínicos. A maioria das flores (54%) não apresentou a formação
3 de um tubo polínico sequer.

4 Quanto à variabilidade genética, os cinco *primers* utilizados geraram 48 *loci*, a maioria
5 polimórficos. Bandas com pouca intensidade e de difícil identificação foram excluídas da
6 análise. O número de fragmentos analisados variou de 04 (primer John) a 14 (primer
7 UBC899) com uma média de 9,6 loci por primer (Tabela 3). O tamanho dos fragmentos
8 variou, aproximadamente, de 200 a mais de 2.000 pares de bases - pb. As populações que
9 apresentaram alelos exclusivos foram da localidade de Ventura (Morro do Chapéu) e Itaetê
10 (Tabela 4), mas nenhuma população apresentou loci exclusivos fixados.

11 O número de alelos gerados por população variou de 35 (Umbuzeiro) a 42 (Itaetê); a
12 média geral foi de 37,8 alelos por população analisada. O grau de polimorfismo variou entre
13 12.5% (Umbuzeiro e Utinga) e 35.4% (Itaetê) e a heterozigosidade média esperada dentro das
14 populações (H_e) variou de 0.045 (Utinga) a 0.132 (Itaetê) (Tabela 4).

15 As Análises Moleculares de Variância (AMOVA), realizadas com as seis populações
16 detectaram maior variação dentro (72%) do que entre as populações (28% - Tabela 5),
17 enquanto que a estruturação genética entre as populações foi de 0.5005 (GST). A taxa de
18 fluxo gênico entre as populações foi de 0.4990.

19 A similaridade genética entre as populações analisadas foi analisada através do índice de
20 similaridade de Nei (1978) (Tabela 6). A maior identidade genética ocorreu entre as
21 populações de Ventura e Itaetê (0.960) e a menor entre as populações de Lençóis e
22 Arapiranga (0.849).

23 A análise de agrupamento (Fig. 6) foi realizada a partir da identidade genética de Nei
24 (1978) (Tabela 6). Nesta análise foi evidenciada a formação de dois grupos entre as

1 populações um com as populações de Itaetê, Ventura e Lençóis e outra com as demais
2 populações (Arapiranga, Umbuzeiro e Utinga).

3

4

DISCUSSÃO

5

6 Mesmo com uma biologia floral que apresenta diversos aspectos em comum à maioria das
7 espécies da família Aristolochiaceae, incluindo a coloração semelhante a cor de carne
8 (Proctor *et al.*, 1996; Bello *et al.*, 2006 e referências neste), não há um mecanismo de
9 aprisionamento muito efetivo nas flores de *A. gigantea*, pois muitos insetos, sobretudo seu
10 principal grupo de visitantes florais, pertencentes a família Phoridae, conseguem facilmente
11 sair das flores ainda que no primeiro dia de aprisionamento. No estudo de Sakai (2002), foi
12 observado que em *A. maxima*, uma espécie que embora seja bem menor que *A. gigantea* (com
13 utrículo medindo de 3.5 x 2.9 cm) e com predominância de visitas por *Megaselia sakaiae*
14 (Phoridae) também ocorre esse tipo de comportamento dos visitantes de deixarem facilmente
15 as flores.

16 A modificação na direção dos tricomas ou mesmo na posição das flores da inflorescência
17 pode ser visualizada em outras espécies (Burgess *et al.*, 2004; Oelschlägel, 2009) e é
18 atribuído como um dos principais fatores por manter os visitantes aprisionados nas flores,
19 impedindo sua saída no primeiro dia e assegurando a polinização específica (Oelschlägel,
20 2009). A ausência de modificação na posição dos tricomas em *A. gigantea* pode explicar o
21 fato de os visitantes não ficarem de fato aprisionados no utrículo, com exceção daqueles com
22 maior tamanho corpóreo como as abelhas *Trigona spinipes*, já que quatro das seis
23 encontradas estavam mortas dentro das flores.

24 Assim a permanência dos visitantes nas flores pode ocorrer para a reprodução desses, já
25 que machos e fêmeas são encontrados nas flores, ou mesmo muitas larvas de Diptera
26 (excluídas das contagens de visitantes florais), oviposição, ou alimentação, sendo registrado o

1 comportamento de moscas da família Phoridae se alimentando de pólen e de néctar. Sakai
2 (2002) também reportou resultado semelhante em flores de *A. maxima* em relação ao
3 comportamento reprodutivo alimentar desses insetos, principalmente por *M. sakaiiae*.

4 Quanto ao horário de antese, embora pouco tenha sido registrado, pode-se notar que há
5 diferenças em algumas espécies de *Aristolochia*, com espécies de antese diurna (Siqueira,
6 1988) e vespertina (Murugan *et al.*, 2006). Em *A. gigantea*, embora o início da separação das
7 sépalas ocorra aproximadamente às 3000 h, o odor e a entrada dos insetos como para outras
8 espécies ocorre pela manhã (*i.e.* Siqueira, 1988; Disney & Sakai, 2000; Burgess *et al.*, 2004).
9 Embora a abertura das flores não seja sincrônica, já que em um mesmo indivíduo ou
10 população ocorre abertura de flores em diferentes períodos, observa-se um número pequeno
11 de flores por planta ao mesmo tempo, o que, aliás, é consistente com os sistemas de floração
12 de lianas (Hilje, 1984; Proctor *et al.*, 1996 *apud* Burgess *et al.*, 2004).

13 A geitonogamia não é improvável nas flores, já que foram observados visitantes se
14 deslocando para flores de um mesmo indivíduo. A auto-compatibilidade em espécies de
15 *Aristolochia* não é incomum, pois dos principais trabalhos recentes em que se investigou o
16 sistema sexual de espécies de *Aristolochia*, três espécies, *A. maxima* (Sakai, 2002), *A.*
17 *manshuriensis* (Nakonechnaya *et al.*, 2008) e *A. arcuata*, apresentaram-se como auto-
18 incompatíveis; enquanto que sete espécies apresentaram-se como auto-compatíveis, *A.*
19 *paucinervis* (Berjano *et al.*, 2006), *A. inflata* (Sakai, 2002), *A. argentina* (Trujillo & Sérsic,
20 2006), *A. tagala* (Murugan *et al.*, 2006), *A. baetica* (Berjano *et al.*, 2011), *A. melastoma* e *A.*
21 *elegans* (Siqueira, 1988).

22 A apomixia e/ou autopolinização, entretanto, não devem ocorrer já que em nenhuma das
23 flores ensacadas houve a formação de frutos. Pela quantidade de sementes contadas nos
24 frutos, já que não foi possível a contagem do número de óvulos, é sugerido que no mínimo
25 300 grãos de pólen sejam necessários para a formação de frutos, já que foi o número mais

1 próximo ao menor encontrado de sementes, e desta forma, flores contendo estigmas em que
2 foram encontrados menos de 70 tubos polínicos não devem formar frutos.

3 Apesar de diferir do odor esperado para espécies de plantas que apresentam síndrome de
4 polinização por moscas, nas flores de *A. gigantea* houve predomínio de visitantes da ordem
5 Diptera. Embora visitantes de outras ordens também ocorram nas flores das espécies do
6 gênero, a ordem Diptera, mais especificamente a família Phoridae representa grande maioria
7 das visitas em *A. argentina* (Trujillo & Sérsic, 2006), *A. grandiflora* (Burgess *et al.*, 2004), *A.*
8 *melastoma* (Siqueira, 1988), *A. maxima* e *A. inflata* (Disney & Sakai, 2001), onde
9 predominam as espécies do gênero *Megaselia*.

10 No estudo realizado por Costa & Hime (1981) com *A. gigantea*, embora tenha sido
11 encontrada uma fauna visitante bastante similar em relação às principais ordens encontradas
12 no presente estudo, foi atribuída à espécie mais abundante do estudo, *Pseudohypocera*
13 *kerteski* (91%), o papel de polinizador efetivo.

14 Na região da Chapada Diamantina, Bahia, considerando a abundância das espécies
15 visitantes, as grandes massas polínicas encontradas aderidas ao corpo e a formação de tubos
16 polínicos, pode-se considerar a espécie *Megaselia* sp. como o polinizador da espécie, mas não
17 podemos descartar a possibilidade de um papel importante na polinização por
18 *Pseudohypocera* sp. Diferenças no polinizador, ainda que pertencente a uma mesma família,
19 podem ocorrer quando se trata de distintas ocorrências geográficas e/ou da comparação de
20 estudos com espécies cultivadas como previamente registrado por Burgess *et al.* (2004).

21 Alguns visitantes de *A. gigantea* são oportunistas, estando nas flores para preda outros
22 animais, isso pode ser visto principalmente pelos visitantes das famílias Staphylinidae
23 (Coleoptera) e Dolichopodidae (Diptera) (Triplehorn & Johnson, 2011) e pelas aranhas que
24 entram nas flores em busca de insetos ou mesmo ficam a espreita destes, fazendo teias na

1 entrada dos utrículos como observado em algumas flores, contudo não se sabe ao certo sobre
2 o real papel desta fauna visitante e as relações presentes.

3 Estudos de variabilidade genética na família Aristolochiaceae são raros. Em um estudo
4 baseado em polimorfismos isoenzimáticos de populações de *A. manshuriensis* na Rússia foi
5 observado alto grau de similaridade genética entre as populações estudadas (Nakonechnaya *et*
6 *al.*, 2007; Koren *et al.*, 2009). Estes estudos foram os primeiros a utilizar marcadores
7 moleculares para estimar a variabilidade genética intrapopulacional na família
8 Aristolochiaceae.

9 A variabilidade genética analisada, com maior divergência dentro das populações e menor
10 entre as populações, indica um padrão reprodutivo alogâmico (Loveless & Hamrick, 1984;
11 Hamrick & Godt, 1996). Contudo, os polinizadores não devem percorrer grandes distâncias,
12 já que o fluxo genético entre populações não é alto, o que seria esperado para espécies
13 polinizadas por visitantes com limitado raio de voo a exemplo das moscas encontradas. A
14 baixa variabilidade genética encontrada, associada a um baixo número de formação de tubos
15 polínicos no estigma sugere a ocorrência de limitação polínica nas populações de estudo.

16 O índice de polimorfismo detectado através de marcadores ISSR nas populações estudadas
17 de *A. gigantea* pode ser considerado de moderado (em Ventura, Lençóis, e Itaetê) a baixo
18 (demais populações). Resultados próximos foram encontrados para espécies endêmicas como
19 em *Proteopsis argentea* (Asteraceae) com polimorfismo médio de 19.2% (Jesus *et al.*, 2001)
20 e outras espécies 26.3% (Hamrick & Godt, 1989 *apud* Jesus *et al.*, 2001) e resultados
21 superiores foram descritos para espécies ameaçadas de extinção como em *Eryngium alpinum*
22 (Apiaceae) com polimorfismo detectado de 54%, nesta espécie também foi detectado um
23 baixo fluxo entre populações (Gaudeul *et al.*, 2000).

24 Diversos são os fatores que podem influenciar na variabilidade genética de populações
25 como o modo de reprodução, sistemas de cruzamento, tamanho populacional, distribuição

1 geográfica, fluxo gênico, taxas de mutação e migração, seleção natural e deriva genética,
2 estruturadas no tempo e espaço (Loveless & Hamrick, 1984). Normalmente espécies de
3 distribuição ampla têm níveis de variação genética maiores quando comparadas com espécies
4 de distribuição geográfica restrita, e conseqüentemente são as que apresentam maior
5 variabilidade intrapopulacional (Cavalli & Winge, 2003). Em *A. gigantea*, embora seja
6 registrada sua ocorrência como espécie cultivada em outros locais fora da área do presente
7 estudo, como em outros estados, as populações registradas na Chapada Diamantina possuem
8 aparentemente distribuição restrita podem estar sofrendo influência do pequeno tamanho
9 populacional, não se sabe se o fluxo com as outras populações cultivadas ocorre.

10 Populações pequenas podem ter sua diversidade genética reduzida devido ao *pool* gênico
11 dos seus fundadores (efeito fundador), ou a eventos de redução populacional (efeito gargalo
12 de garrafa), que podem ter causado uma diminuição do tamanho efetivo da população,
13 induzindo a perda de diversidade genética. Além da seleção natural, na qual os alelos que
14 conferem menor valor adaptativo são eliminados, as populações pequenas também estão mais
15 sujeitas a influência de eventos estocásticos, tais como a deriva genética, o que contribui
16 ainda mais para a redução da variabilidade genética. As populações de Itaetê e Ventura, as
17 maiores encontradas, foram as que apresentaram maiores número de alelos, alelos exclusivos,
18 maior porcentagem de *loci* polimórficos e maior heterozigosidade média esperada neste
19 estudo. Os resultados sugerem assim um efeito significativo do tamanho populacional sobre
20 as populações de *A. gigantea*.

21 A população de Lençóis também apresentou altos índices de polimorfismo quando
22 comparados com outras populações de *A. gigantea* e que pode ter relação além do tamanho
23 populacional com outros parâmetros da paisagem não contemplados no presente estudo,
24 como da presença de mais áreas conservadas que favorecem o deslocamento dos
25 polinizadores. Em estudo de variabilidade genética com *Cattleya elongata* (Orchidaceae),

1 espécie endêmica da Chapada Diamantina, as populações mais polimórficas foram as
2 encontradas em Morro do Chapéu e Lençóis (não havendo populações de Itaetê neste estudo),
3 sendo a alta variabilidade da população de Ventura relacionada supostamente a características
4 ecológicas exclusivas, como respostas adaptativas à ocupação de diferentes nichos levando a
5 seleção de uma diversidade alélica maior (Cruz, 2007). Complementarmente, menores valores
6 de variabilidade genética podem estar relacionados a áreas com maior influência antrópica,
7 como encontrado nas demais populações do estudo, em regiões próximas a criação de gado.

8 A estruturação genética, de forma geral, está relacionada diretamente com o fluxo gênico,
9 uma vez que o aumento do fluxo gênico tende a aumentar a homogeneidade e diminuir a
10 diferenciação (estruturação) das populações (Loveless & Hamrick, 1984). O fluxo gênico, por
11 sua vez, é determinado por características próprias de cada espécie, incluindo o sistema de
12 reprodução, mecanismo de dispersão de grãos de pólen e de sementes (Hamrick & Godt,
13 1996), tamanho populacional efetivo, habilidade de colonização (Sun, 1997) e também com a
14 diferença de tempo transcorrido entre a extinção das populações intermediárias das
15 populações estudadas.

16 A distância geográfica entre as populações de *A. gigante* parece ter relação com a distância
17 genética, com exceção do agrupamento da população de Utinga que ficou mais próxima das
18 populações de Arapiranga e Umbuzeiro, ao invés de Itaetê. Aparentemente mais do que a
19 distância geográfica, por outro lado, o agrupamento parece ser melhor explicado pela
20 existência de dois grupos, o de populações em regiões mais conservadas (Ventura, Itaetê e
21 Lençóis), de maior tamanho e de populações em locais mais antropizados (Arapiranga,
22 Utinga e Umbuzeiro).

23 Desta forma a diversidade genética em nível de metapopulações deveria ser conservada
24 como uma estratégia para incluir várias populações em uma escala regional, reforçando o fato
25 de que estratégias de conservação, não podem se limitar apenas a área de estudo, pois sendo

1 *A. gigantea* uma espécie dependente de polinização por vetores bióticos e com uma síndrome
2 de polinização que mantém o arquétipo para a família, ou seja, a permanência de visitantes da
3 ordem Diptera como potenciais polinizadores, com a ocorrência de pequenas espécies com
4 limitado raio de vôo, o ideal seria a existência de mais populações conectadas para haver
5 maiores taxas de fluxo gênico.

6 Pouco se conhece sobre a perspectiva e manutenção das populações de Phoridae
7 naturalmente, principalmente nos períodos em que não há populações com flores nos locais
8 em que habitam, além disso, sob esta ótica, faltam estudos que esclareçam os reais
9 requerimentos nutricionais de indivíduos desta família ou ordem nas flores de
10 Aristolochiaceae e o que realmente os atraem para as flores, havendo a necessidade de
11 experimentos específicos para elucidar tais questões.

12 Além disso, ainda há que se considerar a influência do marcador utilizado para este estudo.
13 Os baixos valores de diversidade genética estimados pelos marcadores ISSR podem estar
14 relacionados à escolha dos *primers* utilizados para a análise e que não foram desenvolvidos
15 especificamente para a espécie do estudo (Smith *et al.*, 2002). A utilização de um número
16 maior de *primers* para a análise ou de outros conjuntos de *primers* poderia resultar em um
17 maior polimorfismo. Estudos posteriores deveriam também considerar o fluxo incluindo
18 espécies cultivadas e padrão de movimentação de polinizadores nas diferentes populações.

19

20 AGRADECIMENTOS

21

22 Agradecemos a bolsa Capes concedida a JH Sousa pelo Programa de Pós Graduação em
23 Ecologia e Biomonitoramento (UFBA), ao CNPq pela bolsa em produtividade a pesquisa a
24 BF Viana, e pelo auxílio financeiro ao projeto de pesquisa. Agradecemos também aos
25 pesquisadores D Ament (USP), FFde Oliveira (UFBA), T Mahlmann (Inpa), CJB Carvalho
26 (UFPR), M Gotshalck (FURG), J Delabie (UESC), ST Strixino (UFSCAR), E Caron (UFPR)
27 e VC Maia (UFRJ) pela identificação dos visitantes florais. A Fiocruz-Ba pelo uso do
28 microscópio de fluorescência.

29

30

31

LITERATURA CITADA

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23

Andrieu E, Dornier A, Ruifeda S, Schatza B, Cheptoua PO. 2009. The town *Crepis* and the country *Crepis*: How does fragmentation affect a plant-pollinator interaction? *Acta Oecologica* **35**: 1-7.

Barrett SCH, Morgan MT, Husband BC. 1989. The dissolution of a complex genetic polymorphism: the evolution of self-fertilization in tristylous *Eichhornia paniculata*. *Evolution* **43**: 1398–1416.

Bello MA, Valois-Cuesta H, González F. 2006. *Aristolochia grandiflora* SW. (Aristolochiaceae): Desarrollo y Morfología de la flor más larga del mundo. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* **115**: 181-194.

Berjano R, Arista M, Ortiz PL, Talavera S. 2011. Persistently low fruiting success in the Mediterranean pipevine *Aristolochia baetica* (Aristolochiaceae): a multi-year study. *Plant Biology* **13**: 109–117.

Boggs CL. 1988. Rates of Nectar Feeding in Butterflies: Effects of Sex, Size, Age and Nectar Concentration. *Functional Ecology* **2**: 289-295.

Burgess KS, Singfield J, Melendez V, Kevan PG. 2004. Pollination biology of *Aristolochia grandiflora* (Aristolochiaceae) in Vera Cruz, Mexico. *Ann. Missouri Bot. Gard.* **91**: 346–356.

Capellari-Junior L. 1991. *Espécies de Aristolochia L. (Aristolochiaceae) ocorrentes no estado de São Paulo*. Master dissertation, Universidade Estadual de Campinas, Brasil.

Cavalli-Molina S, Winge H. 2003. Variabilidade genética em populações naturais. In.: Freitas LB, Bered F, eds. *Genética e evolução vegetal*. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 165-176.

- 1 **Cheptou PO, Lepart J, Escarre J. 2001.** Inbreeding depression under intraspecific
2 competition in a high outcrossing population of *Crepis sancta* (Asteraceae) evidence for frequency-
3 dependent variation. *American Journal of Botany* **88**: 1424–1429.
- 4 **Costa EL, Hime N. 1981.** Biologia floral de *Aristolochia gigantea* Mart & Zucc
5 (Aristolochiaceae). *Rodriguésia* **56**: 23-32.
- 6 **Cruz DT. 1997.** *Variabilidade genética e morfológica de populações de Cattleya*
7 *elongata Barb.Rodr. (Orchidaceae) na Chapada Diamantina, Bahia.* Master Dissertation,
8 Universidade Estadual de Feira de Santana, Brasil.
- 9 **Dafni A, Kevan PG, Husband BC. 2005.** *Practical Pollination Biology.* Cambridge:
10 Cambridge University Press.
- 11 **Dafni A. 1984.** Mimicry and Deception in Pollination. *Annual Review of Ecology and*
12 *Systematics* **15**: 259-278.
- 13 **Devoto M, Medan D, Montaldo NH. 2005.** Patterns of interaction between plants
14 and pollinators along an environmental gradient. *Oikos* **109**: 461-472.
- 15 **Disney RH, Sakai S. 2001.** Scuttle flies (Diptera: Phoridae) whose larvar develop in
16 flowers of *Aristolochia* (Aristolochiaceae) in Panama. *European Journal of Entomology* **98**:
17 367-373.
- 18 **Dodson CH, Oressler RL, Hills HG, Adams RM, Williams NH. 1969.** Biologically
19 active compounds in orchid fragrances. *Science* **164**: 1243-1249.
- 20 **Doyle JJ, Doyle JL. 1987.** A rapid DNA isolation method for small quantities of
21 fresh tissues. *Phytochemical Bulletin of Botanical Society of America* **19**: 11-15.
- 22 **Endress PK. 1994.** *Diversity and Evolutionary Biology of Tropical Flowers.*
23 Cambridge: Cambridge University Press.
- 24 **Faegri K, Van Der Pijl L. 1979.** *The principles of pollination ecology.* 3th edn.
25 Inglaterra: Pergamon Press.

- 1 **Fenster CB, Armbruster WS, Wilson P, Dudash MR, Thomson, JD. 2004.**
2 Pollination syndromes and floral specialization. *Annual Review of Ecology, Evolution, and*
3 *Systematics* **35**: 375-403.
- 4 **Gaudeul M, Taberlet P, Till-Bottraud I. 2000.** Genetic diversity in an endangered
5 alpine plant, *Eryngium alpinum* L. (Apiaceae), inferred from amplified fragment length
6 polymorphism markers. *Molecular Ecology* **9**: 1625–1637.
- 7 **Hammer O, Harper DAT, Ryan PD. 2001.** PAST: Palaeontological Statistics
8 software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* **4**: 9.
- 9 **Hamrick JL, Godt MJW. 1996.** Effects of life history traits on genetic diversity in
10 plant species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* **351**: 1291-1298.
- 11 **Herrera CM. 1995.** Floral biology, microclimate and pollination by ectothermic bees
12 in an early-blooming herb. *Ecology* **76**: 218-228.
- 13 **Jang EB, Carvalho LA, Stark JD. 1997.** Attraction of Female Oriental Fruit Fly,
14 *Bactrocera dorsalis*, to Volatile Semiochemicals From Leaves and Extracts of a Nonhost
15 Plant, *Panax (Polyscias guilfoylei)* in Laboratory and Olfactometer Assays. *Journal of*
16 *Chemical Ecology* **23**: 1389-1401.
- 17 **Jesus FF, Solferini VN, Semir J, Prado PI. 2001.** Local genetic differentiation in
18 *Proteopsis argentea* (Asteraceae), a perennial herb endemic in Brazil. *Plant Systematics and*
19 *Evolution* **226**: 59-68.
- 20 **Johnson SD, Linder HP, Steiner KE. 1998.** Phylogeny and radiation of pollination
21 systems in *Disa* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* **85**: 402-411.
- 22 **Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF, Donoghue MJ. 2009.**
23 *Sistemática Vegetal: Um Enfoque Filogenético*. 3th edn. Porto Alegre: Artmed.
- 24 **Kearns CA. 1992.** Anthophilous fly distribution across an elevation gradient.
25 *American Midland Naturalist* **127**: 172 - 182.

- 1 **Kearns CA, Inouye DW. 2003.** *Techniques for Pollination Biologists*. Colorado:
2 Univesity Press of Colorado.
- 3 **Koren OG, Nakonechnaya OV, Zhuravlev YN. 2009.** Genetic structure of natural
4 populations of the relict species *Aristolochia manshuriensis* (Aristolochiaceae) in disturbed
5 and intact habitats. *Genetika* **45**: 773-780.
- 6 **Lawrence MK, González F. 2003.** Phylogenetic Relationships in Aristolochiaceae.
7 *Systematic Botany*, **28**: 236-249.
- 8 **Loveless MD, Hamrick JL. 1984.** Ecological determinants of genetic structure in
9 plant populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* **15**: 65-95.
- 10 **Lynch M, Milligan BG. 1994.** Analysis of population genetic structure with RAPD
11 markers. *Molecular Ecology* **3**: 91-99.
- 12 **Mahy G, Jacquemart AL. 1999.** Early Inbreeding Depression and Pollen
13 Competition in *Calluna vulgaris* (L.) Hull. *Annals of Botany* **83**: 697-704.
- 14 **Martin FW, 1959.** Staining and observing pollen tubes in the style by means of
15 fluorescence. *Stain Technology* **34**: 125-128.
- 16 **Martius FP, Zuccarini JG. 1824.** Nova genera et species. *Plantarum*. **1**: 75.
- 17 **McDermott JM, McDonald BA. 1993.** Gene flow in plant pathosystems. *Annual*
18 *Review Phytopathology* **31**: 353-373.
- 19 **Murugan R, Shivanna KR, Rao RR. 2006.** Pollination biology of *Aristolochia*
20 *tagala*, a rare species of medicinal importance. *Current Science* **91**: 795-798.
- 21 **Nanonechnaya OV, Sidorenko VS, Koren OG, Nesterova SV, Zhuravlev YN.**
22 **2008.** Specific Features of Pollination in the Manchurian Birthwort, *Aristolochia*
23 *manshuriensis*. *Biology Bulletin* **35**: 459-465.
- 24 **Nei M. 1978.** Estimation of average heterozigosity and genetic distance from a small
25 number of individual. *Genetics* **89**: 583-590.

- 1 **Neinhuis C, Wanke S, Hilu KW, Muller K, Borsch T. 2005.** Phylogeny of
2 Aristolochiaceae based on parsimony, likelihood, and Bayesian analyses of trnL-trnF
3 sequences. *Plant Systematics and Evolution* **250**: 7–26.
- 4 **Oelschlägel B, Gorb S, Wanke S, Neinhuis C. 2009.** Structure and biomechanics of
5 trapping flower trichomes and their role in the pollination biology of *Aristolochia* plants
6 (Aristolochiaceae). *New Phytologist* **184**: 988–1002.
- 7 **Ollerton J, Watts S. 2000.** Phenotype space and floral typology: Towards an
8 objective assessment of pollination syndromes. Scandinavian Association for Pollination
9 Ecology honours Knut Faegri. *Det Norske Videnskaps-Akademi. I. Matematisk*
10 *Naturvidenskapellige Klasse, Skrifter*, **39**: 149-150.
- 11 **Patterson TB, Givnish TJ. 2003.** Geographic cohesion, chromosomal evolution,
12 parallel adaptive radiations, and consequent floral adaptations in *Calochortus*
13 (Calochortaceae): evidence from cpDNA phylogeny. *New Phytologist* **161**: 253–264.
- 14 **Pauwn A. 2006.** Floral syndromes accurately predict pollination by a specialized oil-
15 collecting bee (*Rediviva peringueyi*, Melittidae) in a guild of South African orchids
16 (*Coryciinae*). *American Journal of Botany* **93**: 917-926.
- 17 **Peakall R, Smouse PE. 2006.** GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population
18 genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* **6**: 288-295.
19 (<http://www.blackwell-synergy.com/doi/abs/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>)
- 20 **Pearse DE, Crandall KA. 2004.** Beyond Fst: Analysis of population genetic data for
21 conservation. *Conservation Genetics* **5**: 585-602.
- 22 **Pearson DL, Dressler RL. 1985.** Two year study of male orchid bee (Hymenoptera:
23 Apidae: Euglossini) attraction to chemical baits in low land south-eastern Peru. *Journal of*
24 *Tropical Ecology* **1**: 37-54.

- 1 **Pérez F, Arroyo MTK, Armesto JJ. 2009.** Evolution of autonomous selfing
2 accompanies increased specialization in the pollination systems of *Schizanthus* (Solanaceae).
3 *American Journal of Botany* **96**: 1168-1176.
- 4 **Pérez F, Arroyo MTK, Medel R, Hershkovitz MA. 2006.** Ancestral Reconstruction
5 of flower morphology and pollination systems in *Schizanthus* (Solanaceae). *American*
6 *Journal of Botany* **93**: 1029-1038.
- 7 **Powell W, Morgante M, Andre C, Hanafey M, Vogel J, Tingey S, Rafalski A.**
8 **1996.** The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for
9 germplasm analysis. *Molecular Breeding* **2**: 225–238.
- 10 **Proctor M, Yéo P, Lack A. 1996.** *The natural history of pollination.* The Bath Press,
11 London, United Kingdom.
- 12 **Real, L. 1983.** *Pollination Biology.* New York: Academic Press.
- 13 **Rulik B, Wanke S, Atthias N, Neinhuis C. 2008.** Pollination of *Aristolochia pallid*
14 Willd. (Aristolochiaceae) in the Mediterranean. *Flora*, **203**: 175-184.
- 15 **Sakai S. 2002.** *Aristolochia* spp. (Aristolochiaceae) pollinated by flies breeding on
16 decomposing flowers in Panama. *American Journal of Botany* **89**: 527-534.
- 17 **Sargent RD, Ackerly DD. 2008.** Plant-pollinator interactions and the assembly of
18 plant communities. *Trends in Ecology and Evolution* **23**: 123-130.
- 19 **Siqueira MR. 1988.** *Biologia floral de três espécies de Aristolochia*
20 *(Aristolochiaceae).* Master Dissertation. Universidade Estadual de Campinas, Brasil.
- 21 **Smith JL, Hunter KL, Hunter RB. 2002.** Genetic variation in the terrestrial orchid
22 *Tipularia discolor.* *Southeastern Naturalist* **1**:17-26.
- 23 **Smith SDW. 2010.** Using phylogenetics to detect pollinator-mediated floral
24 evolution. *New Phytologist* **188**: 354–363.

- 1 **Steffan-Dewenter I, Münzenberg U, Bürger C, Thies C, Tschardt T. 2002.**
2 Scale-dependent effects of landscape context on three pollinator guilds. *Ecology* **83**: 1421–
3 1432.
- 4 **Sun M 1997.** Genetic diversity in three colonizing orchids with contrasting mating
5 systems. *American Journal of Botany* **84**: 224-232.
- 6 **Sweeley EC, Bentley R, Makita M, Wells WW. 1963.** Gas liquid
7 chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substances. *Journal of the*
8 *American Chemical Society* **85**:2497–2507.
- 9 **Torres-Díaz C, Cavieres LA, Muñoz-Ramírez C, Arroyo MTK. 2007.**
10 Consequences of microclimate variation on insect pollinator visitation in two species of
11 *Chaetanthera* (Asteraceae) in the central Chilean Andes. *Revista Chilena de Historia Natural*
12 **80**: 455-468.
- 13 **Triplehorn CA, Johnson NF. 2011.** *Estudo dos Insetos*. São Paulo: Cengage
14 Learning.
- 15 **Trujillo CG, Sérscic AN. 2006.** Floral biology of *Aristolochia argentina*
16 (Aristolochiaceae). *Flora* **201**: 374-382.
- 17 **Warren SD, Harper KT, Booth GM. 1988.** Elevational Distribution of Insect
18 Pollinators. *American Midland Naturalist* **120**: 325-330.
- 19 **Waser NM, Chittka L, Price MV, Williams NM, Ollerton J. 1996.** Generalization
20 in Pollination Systems, and Why it Matters. *Ecology* **77**: 1043-1060.
- 21 **Wilcock C, Neiland R. 2002.** Pollination failure in plants: why it happens and when
22 it matters. *Trends in Plant Science* **7**: 270-277.
- 23 **Wolfe AD, Xiang QY, Kephant SR. 1998.** Assessing hybridization in natural
24 population of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable Inter Simple Sequence
25 Repeat (ISSR) band. *Molecular Ecology* **7**: 1107-1125.

1 **Yeh FC, Boyle T, Rongcai Y, Ye Z, Kiyan JM. 1999.** Popgen *version* 1.31.
2 Microsoft window-based Freeware for Population Genetic Analysis. Center for Internation
3 Forestry Research.
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

TABELAS

Tabela 1. Populações de *Aristolochia gigantea* Mart e Zucc encontradas e utilizadas no presente estudo durante o ano de 2010 localizadas na Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. O símbolo de “*” refere-se às populações selecionadas para realização de análises genéticas e suas respectivas siglas e número de folhas utilizadas.

População *	Município/ Localidade	Coordenadas	Número estimado de indivíduos	Amostra *
	<u>Lençóis:</u>			
LED	Lençóis	12° 33' 47.2" S; 41° 23' 12.7" W	10	09
	Lençóis II	12° 33' 43" S; 41° 23' 32" W	14	10
	<u>Itaetê:</u>			
ITA	Itaetê	12° 56' 39.6" S; 41° 06' 15" W	35	13
	Itaetê II	12° 57' 19.1" S; 41° 05' 45.2" W	15	
	Itaetê III	12° 56' 49.2" S; 41° 06' 18.6" W	10	
	<u>Rio de Contas:</u>			
	Rio de Contas	13° 35' 54" S; 41° 45' 06" W	7	
	Casa de Telha	13° 34' 56.5" S; 41° 42' 29.9" W	3	
UMB	Umbuzeiro	13° 31' 38.5" S; 41° 43' 57.9" W	10	8
ARB	Arapiranga	13° 30' 49.7" S; 41° 46' 41.8" W	10	10
	Arapiranga II	13° 28' 46" S; 41° 46' 07.6" W	15	
	Arapiranga III	13° 28' 51.4" S; 41° 45' 58.8" W	22	
	Arapiranga IV	13° 28' 48.7" S; 41° 45' 59.7" W	11	11
	Arapiranga V	13° 28' 44.8" S; 41° 45' 18" W	7	
	<u>Morro do Chapéu:</u>			
MCV	Ventura	11° 40' 10.4" S; 40° 58' 12" W	40	15
	<u>Utinga:</u>			
UTI	Utinga	12° 02' 06.8" S; 41° 04' 14.7" W	20	10

Tabela 2 . Visitantes florais encontrados no utrículo das flores de *Aristolochia gigantea* Mart e Zucc em diferentes localidades da Chapada Diamantina, Bahia, Brasil durante o ano de 2010.

Ordem Família Espécie	Quantidade	Total	%
Diptera		1203	84.13
Phoridae		1160	81.12
<i>Megaselia</i> sp.	231 machos/ 827 fêmeas		
<i>Megaselia scalaris</i>	1 fêmea		
<i>Neodohrniphora</i> sp.	2 machos		
<i>Pseudohypocera</i> sp.	15 machos/ 69 fêmeas		
<i>Styletta</i> sp.	15		
Cecidomyiidae		2	0.14
<i>Clinodiplosis</i> sp.	2 fêmeas		
Chironomidae		3	0.21
Tribo Tarsini	2 fêmeas		
<i>Chironomus</i> sp.	1 macho		
Lonchaeidae	1	1	0.07
Dolichopodidae		1	0.07
<i>Condylostylus</i> sp.	1 fêmea		
Drosophilidae		22	1.54
<i>Drosophila cardini</i>	2 fêmeas		
<i>Drosophila malerkotliana</i>	2 fêmeas		
<i>Drosophila simulans</i>	6 machos/ 5 fêmeas		
<i>Drosophila</i> sp. (grupo <i>tripunctata</i>)	2 fêmeas		
<i>Rhinoleucophenga</i> sp.	2 fêmeas		
<i>Zaprionus indianus</i>	1 macho/ 2 fêmeas		
Muscidae		2	0.14
<i>Atherigona orientalis</i>	1 fêmea		
<i>Cyrtoneurina</i> sp.	1 fêmea		
Ordens não identificadas		24	1.68
Araneae		7	0.49
Jovens – indeterminadas?	2		
Clubionidae	3		
Salticidae	2		

Ordem	Quantidade	Total	%
Família			
Espécie			
Coleoptera		126	8.81
Nitidulidae	5		
Staphylinidae			
<i>Polylobus</i> sp.	121		
Hemiptera		1	0.07
Cicadellidae	1		
Hymenoptera		69	4.83
Apidae			0.56
<i>Plebeia conf. droryana</i>	5		
<i>Trigona spinipes</i>	6		
<i>Nanotrigona testaceicornes</i>	1		
Chalcidoidea	21	21	1.47
Formicidae		40	2.80
<i>Dolichoderus</i> sp.	23		
<i>Camponotus</i> (Myrmothrix) sp.2	6		
<i>Camponotus conf. atriceps</i>	2		
<i>Camponotus</i> sp.1	1		
<i>Cephalotes pusillus</i> 1	1		
<i>Nylanderia</i> sp.1	1		
<i>Pheidole</i> sp.	2		
<i>Solenopsis geminata</i>	4		
		1430	

Tabela 3. Identificação, sequência, variação de tamanho (em pares de bases - pb) e número de bandas analisadas por *primer* e em média.

<i>Primer</i>	Sequência (5'→3')	Bandas Analisadas	
		Tamanho (pb)	Número
JOHN	(AG)7-YC	1200 - 400	4
MANNY	(CAC)4-RC	1800 - 300	12
MAO	(CTC)4-RC	> 2000 - 600	7
Terry	(GTG) ₃ GGTGRC	> 2000 - 380	11
UBC899	(CA)6-RG	> 2000 - 200	14
Total			44
Média			9,6

Tabela 4. No de alelos (N), No de Alelos exclusivos (E), Percentual de loci polimórficos (P), Heterozigosidade média esperada (*He*), por população. (Ver Tabela 1 para os nomes das populações).

População	N	E	P	<i>He</i>
ARB	36	0	14.6	0.050
ITA	42	3	35.4	0.132
LED	37	0	29.2	0.110
MCV	40	3	27.1	0.085
UMB	35	0	12.5	0.047
UTI	37	0	12.5	0.045
Média	37.8		21.9	0.074

Tabela 5. Análise Molecular de Variância (AMOVA) em populações de *Aristolochia gigantea* Mart e Zucc.

Fonte de variação	df	Soma dos quadrados	Percentual da variação	Componentes da variância	Estatística – F
Entre populações	5	106.228	21.246	1.604	28%
Dentro das populações	59	238.249	4.038	4.038	72%
Total	64	344.477		5.642	100%

Tabela 6. Matriz de identidade (abaixo) e distância (acima) genética de Nei entre as seis populações de *A. gigantea*. Em negrito os valores de maior e menor identidade encontrados entre as populações (Ver Tabela 1 para os nomes das populações).

MCV	ITA	LED	ARB	UMB	UTI	
	0,041	0,114	0,077	0,097	0,122	MCV
0,960		0,115	0,105	0,101	0,105	ITA
0,892	0,892		0,164	0,121	0,140	LED
0,926	0,901	0,849		0,078	0,087	ARB
0,908	0,904	0,886	0,925		0,062	UMB
0,885	0,900	0,869	0,917	0,940		UTI

FIGURAS

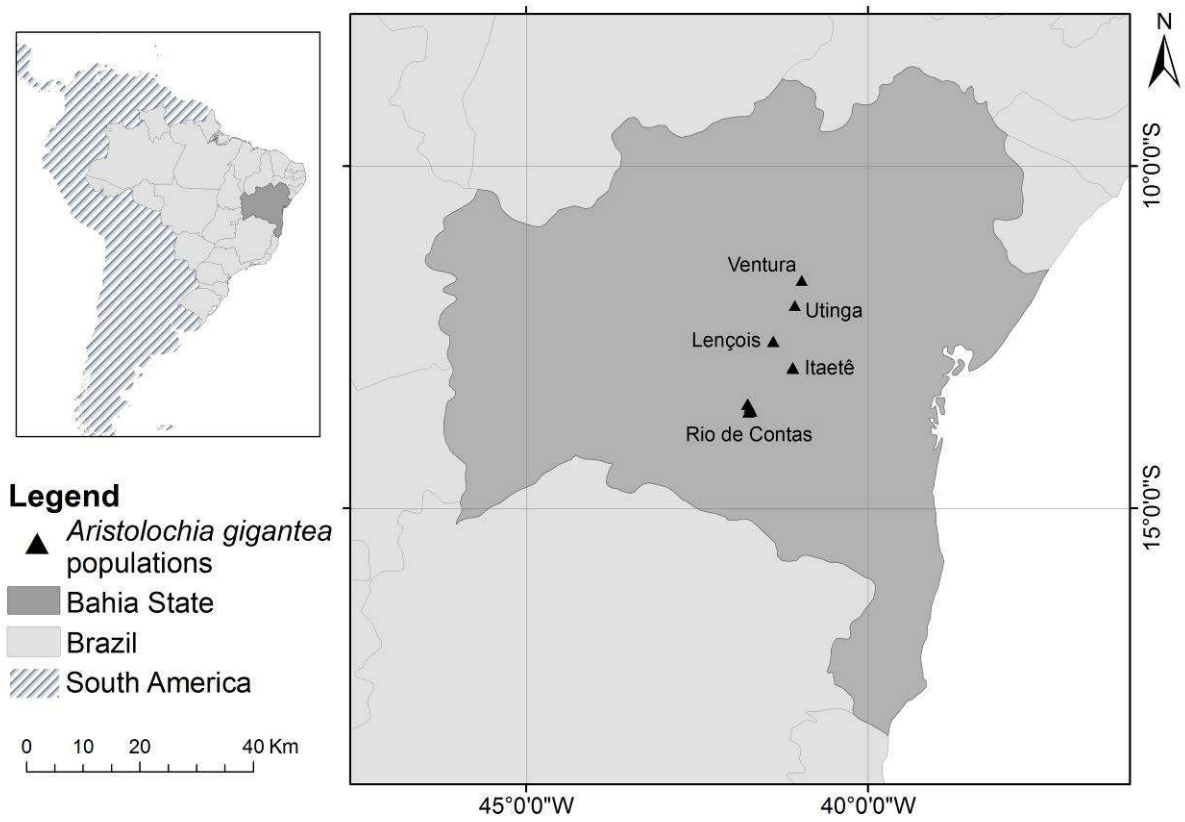


Fig. 1. Mapa com as localizações dos municípios com as populações estudadas de *Aristolochia gigantea* na Chapada Diamantina, Bahia.

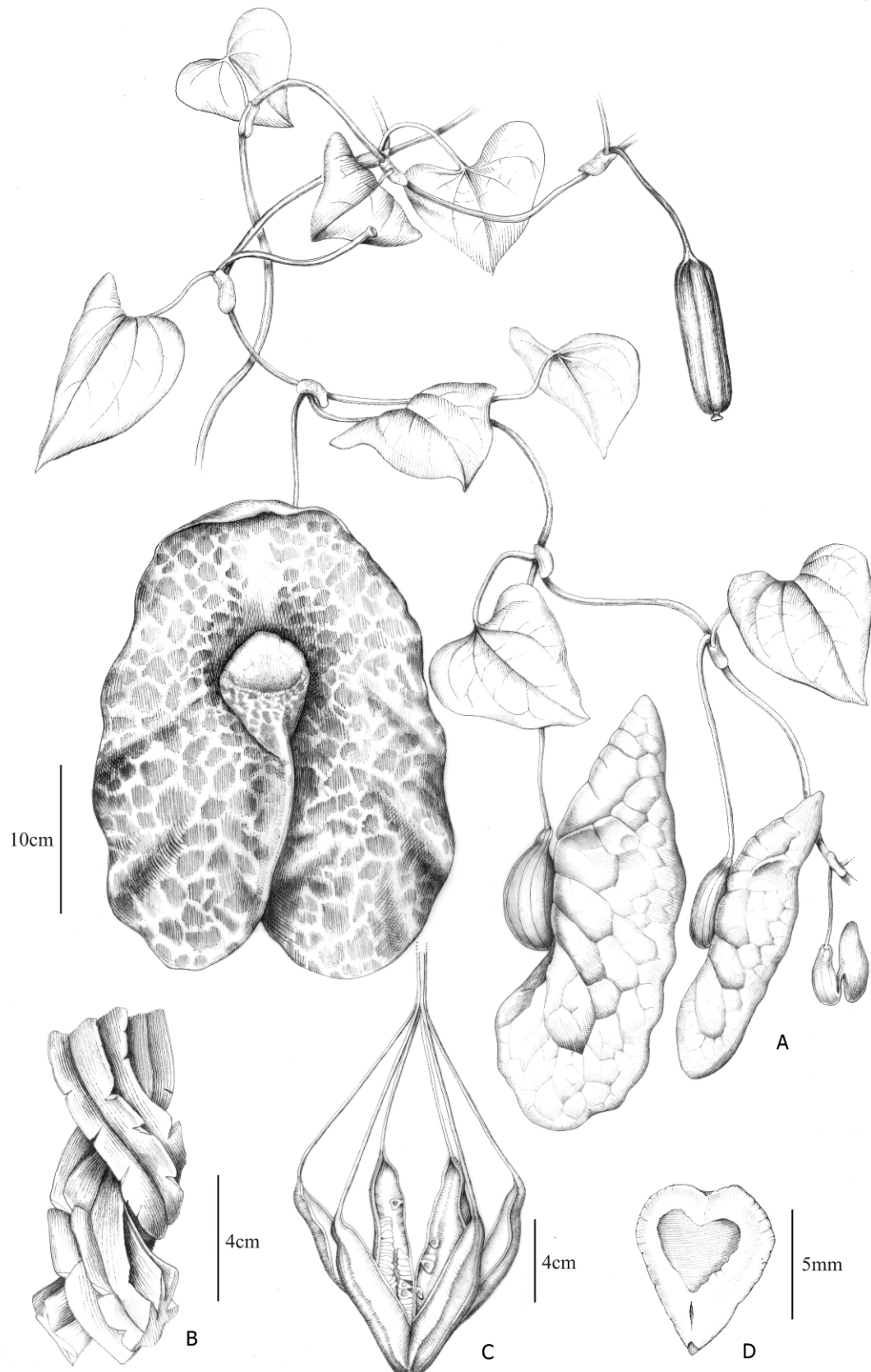


Fig. 2. Prancha de fotos de *Aristolochia gigantea*: (A) em detalhe o hábito da espécie; (B) caule; (C) fruto deiscente e (D) semente. Desenhos: Natanael Nascimento.

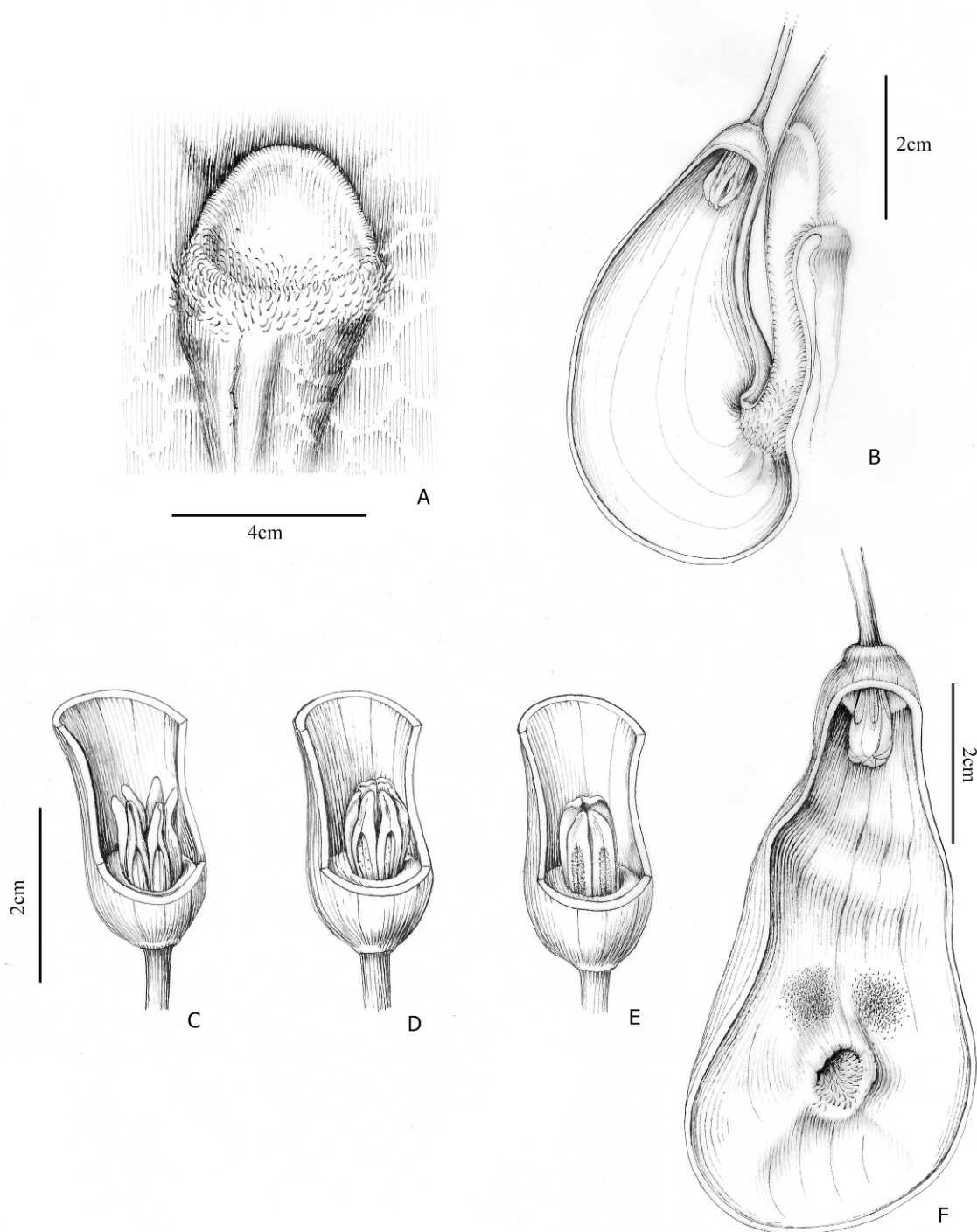


Fig. 3. Prancha de fotos de *Aristolochia gigantea*: em detalhe (A) abertura do utrículo; (B) corte transversal do utrículo; (C) Sequência de modificação do ginostêmio durante a antese com (C) evidenciando a fenofase feminina, em seguida (D) com um momento intermediário em que cessa a receptividade e as anteras iniciam deiscência e em (E) há a total abertura das anteras; (F) Detalhe para o interior do utrículo e nectários, evidenciados pelas regiões escurecidas na figura. Desenhos: Natanael Nascimento.



Fig. 5. Principais visitantes florais e polinizadores de *Aristolochia gigantea* na Chapada Diamantina, Bahia. A. *Pseudohypocera* sp. B. *Megaselia* sp. Fotos: Danilo Ament.

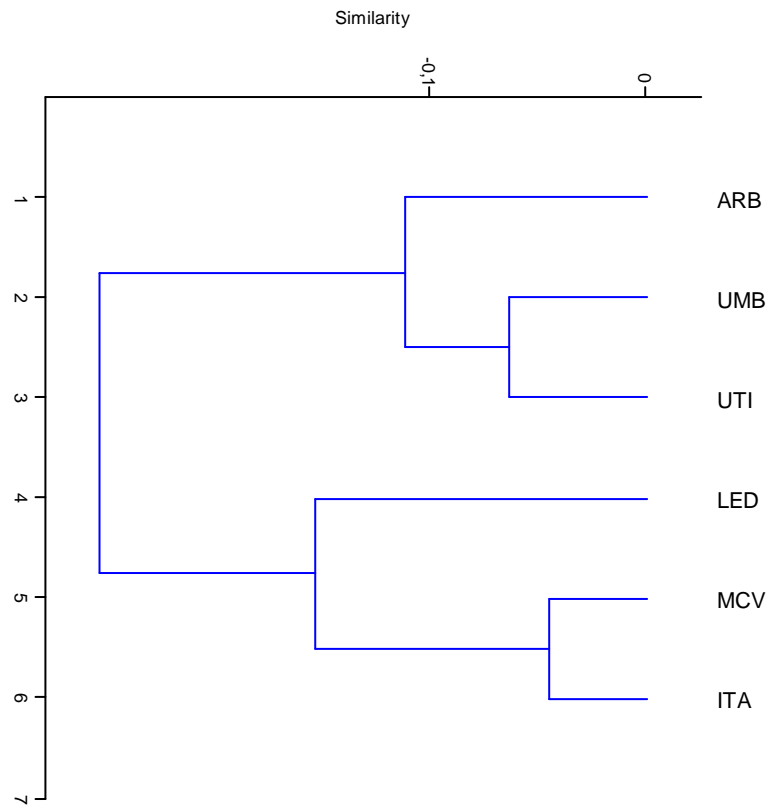


Fig. 6. Análise de agrupamento das populações de *Aristolochia gigantea* na Chapada Diamantina, Bahia, realizado a partir da Identidade Genética de Nei, pelo *Ward's method*. Siglas: MCV= Ventura, Morro do Chapéu, LED= Lençóis, ITA= Itaetê, ARB= Arapiranga, Rio de Contas, UMB= Umbuzeiro, UTI= Utinga.

Artigo 2

Título: Solução de problemas envolvendo a distribuição de uma espécie rara de planta via Modelagem de Nicho Ecológico

Juliana Hipólito¹, Érica Hassui², Blandina F Viana¹

¹*Laboratório de Biologia e Ecologia de Abelhas, Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil, 40.170-110,* ²ECOFRAG, Instituto de Ciências da Natureza, Universidade Federal de Alfenas, Minas Gerais, Brazil, 37130-000.

A ser submetido para:

Periódico: **Journal for Nature Conservation ISSN 1617-1381**

As normas do periódico estão apresentadas no anexo 2

Abstract

Few predictive models were performed with rare or unknown distribution species unlike wide distribution species. One of those examples of poorly studied species is *Aristolochia gigantea*, with very contrasting information's about its distribution. Here in this study we present the distribution, realms, environmental factors responsible for its distribution and comments about previous literature information. The models shows new areas that can be used to find new populations, and our results reinforce the importance of predictive models to study distribution of species, suggesting that ecological niche modeling can provide important contributions to the analysis of biogeographic patterns and processes related to plant species have been little studied.

Key words: Conservation; environmental distances; potential species distribution; plant species.

Introdução

Práticas conservacionistas normalmente utilizam informações de espécies endêmicas ou restritas a determinadas áreas, ou mesmo a riqueza de táxons superiores para identificar possíveis áreas para conservação (van Jaarsveld et al., 1998). Assim, informações sobre a distribuição de espécies, o conhecimento da área de ocorrência, além das informações sobre sua biologia são extremamente importantes.

Dentro deste panorama, tem crescido nos últimos anos ferramentas para a análise de padrões de distribuição geográfica de diversos táxons e em diferentes escalas espaciais (Guisan & Thuiller, 2005; Jiménez-Valverde, 2008). Dentre essas ferramentas, tem sido dada maior atenção aos modelos preditivos de distribuição de espécies, onde o nicho ecológico potencial é modelado a partir da determinação de funções que descrevem características ambientais de pontos de ocorrência conhecidos (Guisan & Zimmermann, 2000). Tais técnicas baseiam-se no conceito de nicho fundamental proposto por Hutchinson (1957), representando intervalos de condições e recursos, em um espaço hipervolumétrico, potencialmente exploráveis por uma espécie, desconsiderando interações bióticas com outras espécies.

De uma forma geral, a modelagem espacial consiste em converter dados primários de registro de espécies em mapas de distribuição geográfica, indicando a provável presença ou ausência da espécie (Araújo & Guisan, 2006). Os algoritmos utilizados tentam estabelecer relações não-aleatórias entre os dados de ocorrência e ausência com variáveis ambientais relevantes para a espécie (p.ex. temperatura, precipitação, topografia, etc).

Diferentemente do que ocorre para espécies com ampla distribuição, entretanto, poucos modelos foram aplicados para espécies raras, pois seus registros de ocorrência geralmente são escassos e normalmente as observações não estão associadas com uma unidade amostral definida (ou área conhecida), faltando acurácia nos dados (Engler et al. 2004, Siqueira et al. 2009). Mesmo assim, a aplicação desta técnica de modelagem é bastante útil em caracterizar distribuições geográficas baseadas em conjuntos de dados muitas vezes incompletos, como em espécies com poucas informações e que podem apresentar erros quanto a sua distribuição (Siqueira et al. 2009). Um desses exemplos de espécies pouco estudadas é a espécie *Aristolochia gigantea* Mart & Zucc, uma angiosperma basal, que dentro do gênero a qual pertence é a mais cultivada para fins ornamentais (Lorenzi & Matos, 2002), provavelmente pela falta de odor fétido nesta espécie.

A primeira descrição de *Aristolochia gigantea* foi realizada no trabalho de Martius & Zuccarini (1824) e seu habitat natural foi atribuído ao estado da Bahia. Mais tarde, no

trabalho de Barringer (1983) registrou-se a ocorrência da planta para as florestas úmidas do Panamá e Brasil Amazônico, embora esse autor registrasse diferenças no material da América Central e América do Sul, sendo as flores deste último, maiores. Outras informações seguem em trabalhos como em Masters (1869), onde a origem da planta é atribuída a locais “em montanhas” na Bahia e Minas Gerais, Bellair & Saint-Léger (1899) que atribuem a origem apenas na Bahia e em Rodrigues (1893), Costa & Hime (1981) e Capellari-Junior (1991) que atribuem sua origem a Bahia e Minas Gerais.

Segundo Capellari-Junior (1991) esta espécie ocorre em regiões do bioma caatinga, porém preferencialmente em áreas úmidas como margens de rios, matas secundárias, pastagens e bordas de estradas, e quando cultivada, desenvolve-se bem em qualquer tipo de solo. Sua adaptabilidade então pode explicar a confusão na origem da espécie, como por exemplo, da espécie reportada por Barringer (1983) na Amazônia que segundo Capellari-Junior (1991), deve ser cultivada.

Registros de herbários mostram que populações de *A. gigantea* também são encontradas em diversos locais como nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Santa Catarina, Paraná, e fora do Brasil na Costa Rica, Panamá e Estados Unidos, em alguns destes há informações complementares sobre a ocorrência da espécie, se natural ou cultivada, em outros não, dificultando a descrição da amplitude de ocorrência da espécie.

Expedições prévias em populações encontradas na Bahia na região da Chapada Diamantina, um local caracterizado por um mosaico de fitofisionomias onde os principais domínios vegetacionais do Estado estão representados, incluindo a Caatinga, o Cerrado e diversos tipos de florestas (Neves & Conceição, 2007), mostraram que as populações de *A. gigantea* encontradas neste local, aparentemente estão isoladas uma das outras em distâncias que parecem superiores a distância de forrageamento de dípteros que comumente polinizam espécies de Aristolochiaceae.

Desta forma, devido à contradição nas informações, aliado a necessidade do conhecimento da distribuição da espécie para entendimento de sua dinâmica populacional e a possibilidade de incorporar áreas potenciais para localização de novas populações, evidenciamos a relevância de estudos que visem esclarecer a distribuição da espécie *Aristolochia gigantea*. Diante desse cenário, o presente trabalho tem como objetivos: (1) descrever a distribuição de *Aristolochia gigantea*; (2) Analisar se há associação entre a distribuição preditiva das espécies e os domínios em que essa se encontra; (3) Analisar se há associação com a distribuição e as informações encontradas na literatura e (4) Avaliar os fatores ambientais responsáveis na determinação dos limites de distribuição.

Métodos

Área de estudo

Sendo a distribuição natural de *Aristolochia gigantea* um aspecto controverso, optamos utilizar as informações mais antigas e mais ocorrentes na literatura que prevêm como áreas de ocorrência natural a Bahia (Martius & Zuccarini, 1824; Bellair & Saint-Léger, 1899) e Minas Gerais (Masters, 1869; Rodigas, 1893; Costa & Hime, 1981; Capellari-Junior, 1991). Todos os demais registros da espécie fora dessas áreas foram excluídos das amostragens por possuírem informações em herbários sobre o seu cultivo.

Desta forma, foram construídos mapas com base na abrangência de dois limites políticos para os estados da Bahia (BA) e Minas Gerais (MG), com o objetivo de aumentar a acurácia do modelo, restringindo a previsão aos limites mais prováveis de ocorrência, como apontam a maior parte dos registros.

Registros de ocorrência

Para modelar a distribuição geográfica potencial de *Aristolochia gigantea*, foram utilizados pontos de ocorrência em trabalho realizado previamente com a ecologia da polinização da espécie durante o ano de 2010, obtidos em campo na região da Chapada Diamantina, Bahia totalizando quinze registros de ocorrência distribuídos em cinco diferentes municípios (Morro do Chapéu, Utinga, Lençóis, Itaetê e Rio de Contas). Estes registros foram obtidos através de buscas nas regiões e locais próximos, com a procura por locais preferencialmente próximos a corpos d'água, sendo anotadas as referências geográficas com auxílio de GPS, em locais sempre muito próximos aos indivíduos ou em um ponto aproximadamente central na população.

Demais pontos de ocorrência foram obtidos de registros de herbários e através da página do *SpeciesLink*. Após serem filtradas as ocorrências sem informações completas, ou repetidas obtivemos um total de 53 registros (incluindo os obtidos em campo).

Seleção das Variáveis Ambientais

Não sendo muito frequentes os trabalhos com lianas na literatura, a seleção das variáveis ambientais foi baseada na ecofisiologia de espécies vegetais em geral considerando aspectos

de dependência de água, interface com outras fisionomias e de aspectos geomorfológicos e topográficos (Guarino & Walter, 2005). Desta forma, optamos pela utilização das seguintes variáveis: Drenagem e fertilidade do solo; Altitude; Precipitação do trimestre mais seco; Precipitação do trimestre mais úmido; Temperatura média anual; Temperatura máxima do mês mais quente; Temperatura mínima do mês mais frio; Precipitação anual.

Variáveis bioclimáticas foram obtidas a partir do projeto WorldClim (Hijmans et al., 2005) com resolução espacial de 30 segundos de arco (aproximadamente 1 km). Os modelos digitais de vegetação, drenagem e fertilidade do solo foram obtidas no site da Embrapa Solos (disponível em <http://mapoteca.cnps.embrapa.br/geoacervo>) em 1:5,000,000 e foram reajustadas para a resolução de cerca de 900m para comparação com demais variáveis e também no portal *World Soil Information* (disponível em <http://www.isric.org/>). Por fim, as variáveis topográficas foram retiradas do site do “Shuttle Radar Topography Mission” (SRTM) (disponível em <http://www.worldclim.org/current.htm>) com resolução de 30 segundos de arco.

Construção dos Modelos

Para gerar os modelos de distribuição potencial foi utilizado o algoritmo MAXENT - Maximum Entropy versão 3.3.1(Phillips et al., 2006), que através de um processo de otimização, relaciona a presença das espécies com características do ambiente, utilizando o princípio da máxima entropia. Para processar conjuntos de dados pequenos, este algoritmo tem apresentado melhor desempenho do que outros como o GARP ou SVM (Elith et al., 2006; Nabout et al., 2009). Além disso, requer apenas dados de presença, podendo utilizar variáveis contínuas e categóricas o que permite incorporar maior interações entre diferentes variáveis (Phillips et al., 2006; Elith et al., 2011).

A idéia da aplicação do Maxent para modelos de distribuição de espécies é estimar a probabilidade de ocorrência da espécie encontrando a distribuição de probabilidade da máxima entropia, sujeita a um conjunto de restrições que representam a informação incompleta sobre a distribuição das espécies de interesse. O modelo de saída do Maxent para uma determinada espécie é uma superfície continua de valores entre 0 e 100, onde altos valores indicam maior probabilidade de encontrar a espécie (Guisan & Zimmermann, 2000).

A construção do modelo para avaliar a distribuição de *A. gigantea* foi feita com uma análise de *bootstrap* (reamostragem) para 1000 repetições, com o objetivo de obter

probabilidades maiores para a ocorrência da espécie, sendo utilizada a proporção de 70% de dados para treino e 30% dos dados para teste.

Avaliação do Modelo

Para avaliar a qualidade dos modelos de distribuição gerados pelo MAXENT, realizou-se a análise da curva característica de operação (ROC) que avalia o desempenho do modelo através de um único valor que representa a área sob a curva (AUC). A análise ROC é baseada na medida da sensibilidade, que é a taxa de verdadeiros positivos (ausência de erro de omissão) versus a especificidade que é a taxa de falso positivo (erro de sobreprevisão). Quanto mais próximo de 1 for a área sob a curva (AUC), mais distante o resultado do modelo é da previsão aleatória, ou seja, melhor o desempenho do modelo (Phillips et al., 2006).

A importância das variáveis na distribuição potencial das espécies foi estimada utilizando-se o teste de importância das variáveis ambientais, o qual apresenta uma estimativa da contribuição relativa das variáveis utilizadas para gerar os modelos do MAXENT.

Resultados

O modelo obtido teve medida de acurácia, com valor de 0.853, e demonstrou uma maior probabilidade para a região nordeste na Chapada Diamantina e uma baixa probabilidade em outros locais na região do estado de Minas Gerais (Figura 1). Complementarmente, o modelo demonstrou a probabilidade de ocorrência em outros locais em que não há registros da espécie para os dois estados em um cenário de previsão máxima (Figura 1A). Para um cenário com previsão mínima o modelo gerado demonstra uma distribuição bastante restrita da espécie e apenas para o estado da Bahia (Figura 1B).

Variáveis associada à água como a precipitação do semestre mais chuvoso e também do solo como a fertilidade e drenagem foram as variáveis que tiveram maior explicação para o modelo (22%, 19% e 17% respectivamente) enquanto que as variáveis topográficas e de temperatura, foram as que menos contribuíram para a explicação do modelo (Tabela 1).

Discussão

O mapa gerado demonstrou uma maior probabilidade de ocorrência na região da Chapada Diamantina (Figura 1), e por isso, os resultados talvez expliquem o porquê da afirmação de

autores para a ocorrência da espécie apenas na Bahia. Esta região da Chapada Diamantina, entretanto, é caracterizada por um mosaico de fitofisionomias (Neves & Conceição, 2007), e como demonstrado por Siqueira & Duringan (2007), nos casos de modelos em que o bioma não é único, a eficácia pode ser comprometida. Um modelo mais inclusivo, como foi o objetivo deste trabalho, contudo, demonstra que a espécie tem condições de sobreviver em uma previsão máxima na maior parte dos estados da Bahia e Minas, mas possui probabilidade maior de ser encontrada na Bahia, na região da Chapada Diamantina.

Assim, a previsão do modelo, corrobora a atribuição da origem da espécie aos estados da Bahia e Minas Gerais, como realizado por: Masters, 1869; Rodigas, 1893; Costa & Hime, 1981; Capellari-Junior, 1991. Sua ocorrência, contudo, pode indicar um menor esforço de coleta para o estado de Minas Gerais e/ou supressão das populações naturais no estado, o que influenciou na quantidade de registros, sendo importante a detecção de tais áreas para conservação.

Nossos resultados, podem ainda ter sofrido um viés quanto a quantidade de pontos utilizados para a modelagem, já que para o estado de Minas Gerais obtivemos apenas nove pontos, não havendo a possibilidade de excursões a campo. Ao analisarmos os registros, entretanto, optamos pela não exclusão de pontos na Bahia para equivaler o modelo, pois ficaríamos com poucos pontos, podendo comprometer mais ainda a sua qualidade, sendo demonstrado previamente por Hernandez et al. (2006) que para o uso do Maxent, o ideal é a utilização de no mínimo 50 pontos de ocorrência.

Notamos que a distribuição dos registros para a espécie é mais ou menos homogênea dentro dos limites conhecidos (Chapada Diamantina), embora com um recorte (BA MG) muito maior do que o limite máximo da distribuição dos pontos. Por este motivo também, o modelo pode perder a acurácia e ter erros de sobreprevisão (indicando áreas adequadas onde a espécie não ocorre), mas sendo o objetivo do estudo, não simplesmente descrever a distribuição geográfica da espécie, mas encontrar áreas potenciais de provável ocorrência fora da área atualmente conhecida optamos pela permanência dos registros, mesmo podendo incidir em erros.

Os resultados apresentados neste estudo reforçam a importância dos modelos preditivos no estudo da distribuição de espécies, sugerindo que a modelagem de nicho ecológico pode fornecer importantes contribuições para a análise de padrões e processos biogeográficos relacionados a espécies de plantas pouco estudadas. Expedições nas áreas em que não há registros da espécie devem ser realizadas para validar o modelo, entretanto, a não ocorrência de populações nos locais previstos pode nos remeter a outras questões que poderiam explicar

a distribuição de *Aristolochia gigantea*, ambas com conseqüências para a viabilidade da manutenção da espécie, como: (1) a distribuição pode ter sido continua e ampla em um tempo geológico, posteriormente houve a criação de uma barreira geográfica, como a criação de estradas, com a extinção das populações intermediárias separando e isolando as populações ou; (2) a ocorrência da dispersão à longa distancia do centro de origem, como o cultivo por ação antrópica e boa adaptação aos novos locais.

Práticas de conservação devem levar em consideração a maior quantidade de informação disponível para as espécies, não apenas quanto a sua distribuição, mas também quanto aos requerimentos para a manutenção de suas populações, levando em consideração fatores genéticos e de fluxo gênico, promovidos pela dispersão de pólen e sementes, considerando deslocamentos de populações naturais de polinizadores e dispersores.

Referências Bibliográficas

Araújo, M. B. & Guisan A. (2006). Five (or so) challenges for species distribution modelling. *Journal of Biogeography*, 33, 1677-1688.

Barringer, K. (1983). Notes on central American Aristolochiaceae. *Brittonia*, 35, 171-174.

Bellair, G. & Saint-Leger, L. (1899). *Les plants de serr.* Paris: Octave Doin.

Capellari-Junior, L. (1991). *Espécies de Aristolochia L. (Aristolochiaceae) ocorrentes no estado de São Paulo.* Master dissertation, Universidade Estadual de Campinas.

Costa, E. L. & Hime, N. (1981). Biologia floral de *Aristolochia gigantea* Mart & Zucc (Aristolochiaceae). *Rodriguésia*, 56, 23-32.

Elith, J., Phillips, S. J., Hastie, T., Dudík, M., Chee, Y. E. & Yates, C. J. (2011) A statistical explanation of MaxEnt for ecologists. *Diversity and Distributions*, 17, 43-57.

Elith, J., Graham, C. H., Anderson, R. P., Dudik, M., Ferrier, S., Guisan, A., Hijmans, R. J., Huettmann, H., Leathwic, J. R., Lehmann, A., Li, J., Lohmann, L. G., Loiselle, B. A., Manion, G., Moritz, C., Nakamura, M., Nakazawa, Y., Overton, J. C., Peterson, A. T., Phillips, S. J., Richardson K., Scachetti, Pereira, R., Schapire, R. E., Soberon, J., Williams, S., Wisz, M. S. & Zimmermann, N. E. (2006). Novel methods improve Prediction of species' distributions from occurrence data. *Ecography*, 29, 129–151.

Engler, R., Antoine G., & Rechsteiner, L. (2004). An improved approach for predicting the distribution of rare and endangered species from occurrence and pseudo-absence data. *Journal of Applied Ecology*, 41, 263–274.

Guarino, E. S. G. & Walter, B. M. T. (2005). Fitossociologia de dois trechos inundáveis de matas de galeria no Distrito Federal, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, 19, 431-442.

Guisan, A. & Thuiller, W. (2005) Predicting species distribution: offering more than simple habitat models. *Ecology Letters*, 8, 993-1009.

Guisan, A. & Zimmermann, N. E. (2000). Predictive habitat distribution models in ecology. *Ecological Modeling*, 135, 147-186.

Hernandez, P. A., Graham, C. H., Master, L. L. & Albert, D. L. (2006). The effect of sample size and species characteristics on performance of different species distribution modeling methods. *Ecography*, 29, 773-785.

Hijmans, R. J., Cameron, S. E., Parra, J. L., Jones, P. G. & Jarvis, A. (2005) Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology*, 25, 1965-1978.

Hutchinson, G. E. (1957). Concluding remarks. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 22, 415-427.

Jiménez-Valverde, A., Lobo J. M. & Hortal, J. (2008). Not as good as they seem: the importance of concepts in species distribution modeling. *Diversity and Distributions*, 14, 885-890.

Lorenzi, H. & Matos, F. J. A. (2002). *Plantas Mediciniais no Brasil nativas e exóticas*. Nova Odessa, SP: Plantarum.

Martius, F. P. & Zuccarini, J. G. (1824). Nova genera et species. *Plantarum*, 1, 75.

Masters M. T. (1869). *Vegetable teratology*. London: Ray Society.

Nabout, J. C., Júnior, M. P., Bini, M. L. & Diniz-Filho, J. A. F. Distribuição geográfica potencial de espécies americanas do caranguejo “violonista” (*Uca* spp.) (Crustacea, Decapoda) com base em modelagem de nicho ecológico. (2009). *Iheringia*, 99, 92-98.

Neves, S. P. S. & Conceição A. A. (2007). Vegetação em afloramentos rochosos na serra do Sincorá, Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. *Sitientibus Série Ciências Biológicas*, 1, 36-45.

Phillips, S. J., Anderson, R. P. & Schapire, R. E. (2006) Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling*, 190, 231-259.

Rodigas, E. (1893). *Aristolochia gigantea* Mart et Zucc. *L'illustration Horticole*, 40, 29.

Siqueira, M. F. & Durigan, G. (2007). Modelagem da distribuição geográfica de espécies lenhosas de cerrado no Estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Botânica*, 30, 233-243.

Siqueira, M. F., Durigan, G., DE Marco Junior, P., Peterson, T. (2009). Something from nothing: Using landscape similarity and ecological niche modeling to find rare plant species. *Journal for Nature Conservation*, 17, 25-32.

van Jaarsveld, A. S., Freitag, S., Chown, S. L., Muller, C., Koch, S., Hull, H., Bellamy, C., Kruger, M., Endrody-Younga, S., Mansell, M. W., Scholtz, C. H. (1998) Biodiversity assessment and conservation strategies. *Science*, 279, 2106-2108.

Apêndice

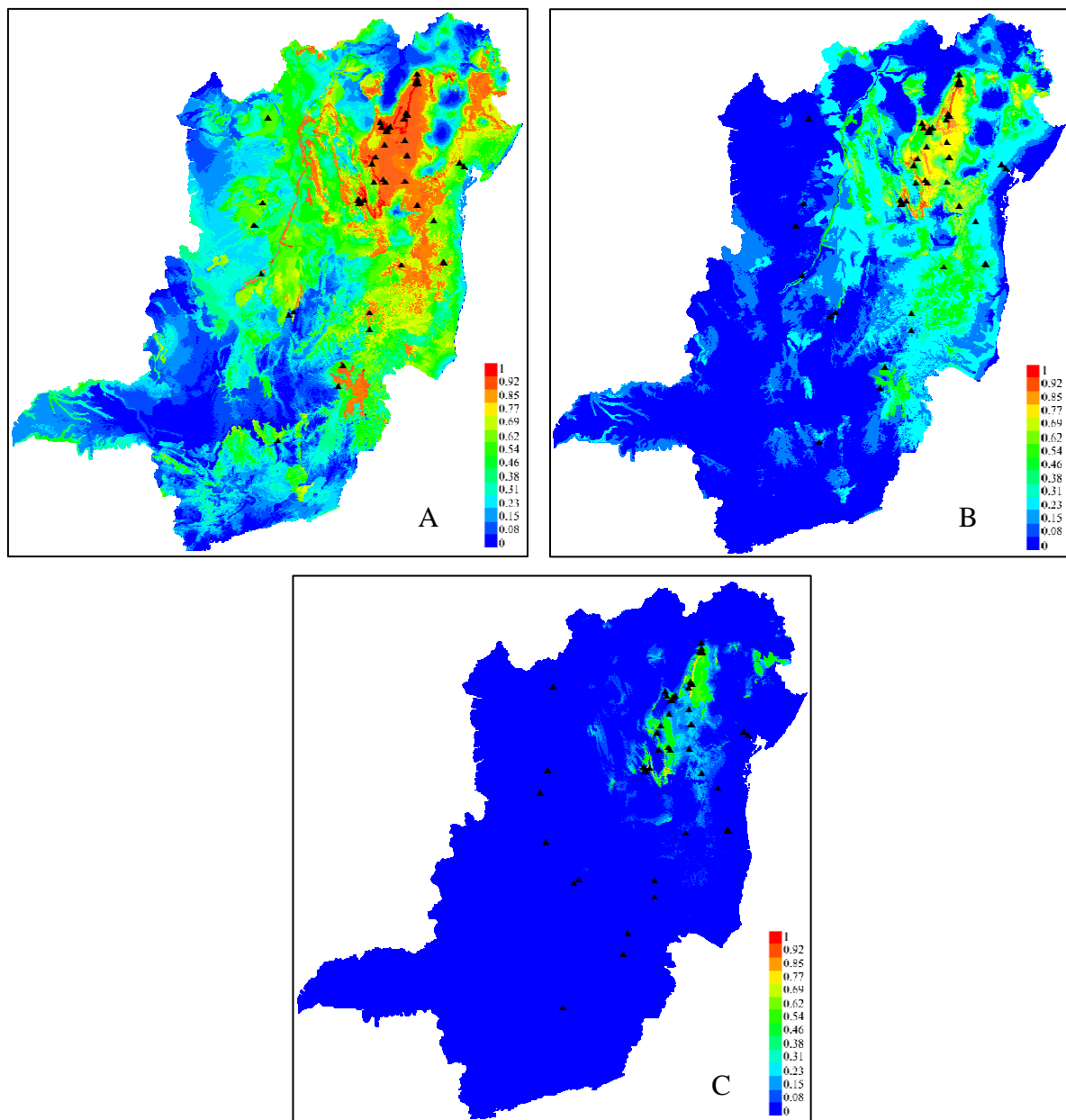


Figura 1: Representação do modelo do algoritmo Maxent com o método de bootstrap para a distribuição da espécie *Aristolochia gigantea* nos estados da Bahia e Minas Gerais. Nos mapas estão representados os valores máximos, medianos e mínimos de ocorrência, respectivamente. As cores mais quentes (vermelho) demonstram área com maior probabilidade de ocorrência, da mesma forma que a numeração respectiva às cores: representadas pelo número 1 até zero, diminui a probabilidade de ocorrência.

Tabela 1: Contribuição das variáveis ambientais em percentual da modelagem de nicho de *Aristolochia gigantea* com o algoritmo Maxent, referente aos mapas das figura 1. Na tabela Precipitação (1) refere-se a Precipitação do trimestre mais chuvoso; Precipitação (2) a Precipitação do trimestre mais quente; Temperatura (1) a Temperatura mínima do período mais frio; Temperatura (3) a Temperatura máxima do período mais quente:

	Precipitação (1)	Fertilidade	Precipitação anual	Drenagem	Precipitação (2)	Altitude	Vegetação	Temperatura (1)	Temperatura anual	Temperatura (3)
Mapa Bahia- Minas	0	17.9	11.6	14.9	14.9	5.5	8.1	5.7	1.5	1.3

Conclusão Geral

Este estudo com populações nativas (não cultivadas) de *Aristolochia gigantea*, demonstra aspectos complementares para a ecologia da polinização no gênero, evidenciando que a mudança de um odor notoriamente fétido para um odor de citronela não resultou em grandes modificações da fauna visitante. Os pequenos polinizadores desta espécie, aparentemente da família Phoridae, não parecem estar conseguindo ter sucesso na manutenção de tais populações, evidenciadas por um baixo número de estigmas com grande formação de tubos polínicos e pela baixa variabilidade genética, provavelmente fruto de populações fragmentadas e isoladas.

Embora sem evidências de expedições a campo para corroborar os resultados obtidos na modelagem de nicho ecológico da espécie, o estudo demonstrou a importância desses modelos para análise de padrões e processos biogeográficos relacionados a espécies de plantas pouco estudadas, aliado ao preenchimento de lacunas existentes na literatura quanto a distribuição da espécie. Assim, o trabalho apresenta aspectos importantes para a conservação da espécie e de seus polinizadores, considerando aspectos genéticos e de viabilidade das populações considerando diferentes perspectivas.

Referências Bibliográficas da Introdução Geral

Aizen MA, Feinsinger P. 1994. Forest Fragmentation, Pollination, and Plant Reproduction in a Chaco Dry Forest, Argentina. *Ecology* **75**: 330-351.

Aker CL, Udovic D. 1981. Oviposition and Pollination Behavior of the Yucca Moth, *Tegeticula maculata* (Lepidoptera: Prodoxidae), and Its Relation to the Reproductive Biology of *Yucca whipplei* (Agavaceae). *Oecologia* **49**: 96-101.

Almeida MJOF, Naves RV, Ximenes PA. 2000. Influência das abelhas (*Apis mellifera*) na polinização da Gabiroba (*Campomanesia* spp.). *Pesquisa Agropecuária Tropical* **30**: 25-28.

Alves JE, Freitas BM. 2007. Requerimentos de polinização da goiabeira. *Ciência Rural* **37**: 1281-1286.

Andrieu E, Dornier A, Ruifeda S, Schatza B, Cheptoua PO. 2009. The town *Crepis* and the country *Crepis*: How does fragmentation affect a plant-pollinator interaction? *Acta Oecologica* **35**: 1-7.

Arroyo MTK, Muñoz MS, Henríquez C, Till-Bottraud I, Pérez F. 2006. Erratic pollination, high selfing levels and their correlates and consequences in an altitudinally widespread above-tree-line species in the high Andes of Chile. *Acta Oecologica* **30**: 248-257.

Baker HG. 1955. Self-Compatibility and Establishment After 'Long-Distance' Dispersal. *Evolution* **9**: 347-349.

Barringer K. 1983. Notes on central American Aristolochiaceae. *Brittonia* **35**: 171-174.

Bellair G, Saint-Leger L. 1899. *Les plants de serr.* Paris: Octave Doin.

Bello MA, Valois-Cuesta H, González F. 2006. *Aristolochia grandiflora* SW. (Aristolochiaceae): Desarrollo y Morfología de la flor más larga del mundo. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* **115**: 181-194.

Berjano R, Arista M, Ortiz PL, Talavera S. 2011. Persistently low fruiting success in the Mediterranean pipevine *Aristolochia baetica* (Aristolochiaceae): a multi-year study. *Plant Biology* **13**: 109-117.

Boggs CL. 1988. Rates of Nectar Feeding in Butterflies: Effects of Sex, Size, Age and Nectar Concentration. *Functional Ecology* **2**: 289-295.

Burgess KS, Singfield J, Melendez V, Kevan PG. 2004. Pollination biology of *Aristolochia grandiflora* (Aristolochiaceae) in Vera Cruz, Mexico. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **91**: 346–356.

Capellari-Junior L. 1991. *Espécies de Aristolochia L. (Aristolochiaceae) ocorrentes no estado de São Paulo*. Master dissertation, Universidade Estadual de Campinas, Brasil.

Carvalho DA, Oliveira PE. 2003. Biologia reprodutiva e polinização de *Senna sylvestris* (Vell.) H.S. Irwin & Barneby (Leguminosae, Caesalpinioideae). *Revista Brasileira de Botânica* **26**: 319-328.

Carvalho R, Machado IC. 2006. *Rodriguezia bahiensis* Rchb. f.: biologia floral, polinizadores e primeiro registro de polinização por moscas Acroceridae em Orchidaceae. *Revista Brasileira de Botânica* **29**: 461-470.

Charlesworth D, Charlesworth B. 1987. Inbreeding Depression and its Evolutionary Consequences. *Annual Review of Ecology and Systematics* **18**: 237-268.

Cheptou PO, Lepart J, Escarre J. 2001. Inbreeding depression under intraspecific competition in a high outcrossing population of *Crepis sancta* (Asteraceae) evidence for frequency-dependent variation. *American Journal of Botany* **88**: 1424–1429.

Costa EL, Hime N. 1981. Biologia floral de *Aristolochia gigantea* Mart & Zucc (Aristolochiaceae). *Rodriguésia* **56**: 23-32.

Crema S, Cristofolini G, Rossi M, Conte L. 2009. High genetic diversity detected in the endemic *Primula apennina* Widmer (Primulaceae) using ISSR fingerprinting. *Plant systematics and evolution* **280**: 29–36.

Cunningham SA. 2000. Depressed pollination in habitat fragments causes low fruit set. *Proceedings of the Royal Society B* **267**: 1149-1152.

Dafni A. 1984. Mimicry and Deception in Pollination. *Annual Review of Ecology and Systematics* **15**: 259-278.

Darwin C. 1862. *On the various contrivances by which British and foreign orchids are fertilised by insects*. London: John Murray.

De Holanda-Neto JP, Freitas BM, Bueno DM, De Araujo ZB. 2002. Low seed/nut productivity in cashew (*Anacardium occidentale*): Effects of self-incompatibility and honey bee (*Apis mellifera*) foraging behavior. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* **77**: 226-231.

Devoto M, Medan D, Montaldo NH. 2005. Patterns of interaction between plants and pollinators along an environmental gradient. *Oikos* **109**: 461-472.

Dodson CH, Oressler RL, Hills HG, Adams RM, Williams NH. 1969. Biologically active compounds in orchid fragrances. *Science* **164**: 1243-1249.

Ellstrand NC, Elam DR. 1993. Population genetic consequences of small population size: Implications for Plant Conservation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **24**: 217-242.

Endress PK. 1994. *Diversity and Evolutionary Biology of Tropical Flowers*. Cambridge: Cambridge University Press.

Eriksen B, Molau U, Svensson M. 1993. Reproductive Strategies in Two Arctic *Pedicularis* Species (Scrophulariaceae). *Ecography*, **16 (2)**: 154-166

Faegri K, Van Der Pijl L. 1979. *The principles of pollination ecology*. 3th edn. Inglaterra: Pergamon Press.

Free JB. 1993. *Insect pollination of crops*, 2th edn. Londres: Academic Press.

Galen C, Gregory T, Galloway LF. 1989. Costs of self-pollination in a self-incompatible plant, *Polemonium viscosum*. *American Journal of Botany* **76**: 1675-1680.

Giménez-Benavides L, Dötterl S, Jürgens A, Escudero A, Iriondo JM. 2007. Generalist diurnal pollination provides greater fitness in a plant with nocturnal pollination syndrome: assessing the effects of a *Silene - Hadena* interaction. *Oikos* **116**: 1461–1472.

González F. 1998. New species of *Aristolochia* (Aristolochiaceae) from Brazil and Peru. *Brittonia* **50**: 5-10.

Goodwillie C, Kalisz S, Eckert CG. 2005. The evolutionary enigma of mixed mating systems in plants: Occurrence, Theoretical. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **36**: 47–79.

Gould SJ, Vrba ES. 1982. Exaptation - A Missing Term in the Science of Form. *Paleobiology* **8**: 4-15.

Goverde M, Schweizer K, Baur B, Erhardt A. 2002. Small-scale habitat fragmentation effects on pollinator behaviour: experimental evidence from the bumblebee *Bombus veteranus* on calcareous grasslands. *Biological Conservation* **104**: 293-299.

Herrera CM. 1995. Floral biology, microclimate and pollination by ectothermic bees in an early-blooming herb. *Ecology* **76**: 218-228.

Herrera CM. 1996. Floral traits and plant adaptation to insect pollinators: a devil's advocate approach. In: Lloyd DG, Barrett SCH, eds. *Floral biology*. Chapman and Hall: New York, 65-87.

Hingston AB, Mc Quillan PB. 2000. Are pollination syndromes useful predictors of floral visitors in Tasmania? *Austral Ecology* **25**: 600-609.

Jang EB, Carvalho LA, Stark JD. 1997. Attraction of Female Oriental Fruit Fly, *Bactrocera dorsalis*, to Volatile Semiochemicals From Leaves and Extracts of a Nonhost Plant, Panax (*Polyscias guilfoylei*) in Laboratory and Olfactometer Assays. *Journal of Chemical Ecology* **23**: 1389-1401.

Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF, Donoghue MJ. 2009. *Sistemática Vegetal: Um Enfoque Filogenético*. 3th edn. Porto Alegre: Artmed.

Kearns CA, Inouye DW. 2003. *Techniques for Pollination Biologists*. Colorado: Univesity Press of Colorado.

Kearns CA. 1992. Anthophilous fly distribution across an elevation gradient. *American Midland Naturalist* **127**: 172 - 182.

Kevan PG. 1984. Pollination by Animals and Angiosperm Biosystematics. In: Grant WF, ed. *Plant biosystematics*. Toronto: Academic Press, 271-292.

Keys RN, Buchmann SL, Smith SE. 1995. Pollination Effectiveness and Pollination Efficiency of Insects Foraging *Prosopis velutina* in South-Eastern Arizona. *Journal of Applied Ecology* **32**: 519-527.

Kunin WE. 1993. Sex and the Single Mustard: Population Density and Pollinator Behavior Effects on Seed-Set. *Ecology* **74**: 2145-2160.

Laporta C. 2005. Floral biology and reproductive system of enantiostylous *Senna corymbosa* (Caesalpiniaceae). *Revista de Biologia Tropical* **53**: 49-61.

Lau JA, Galloway LF. 2004. Effects of low-efficiency pollinators on plant fitness and floral trait evolution in *Campanula americana* (Campanulaceae). *Oecologia* **141**: 577–583.

Lawrence MK, González F. 2003. Phylogenetic Relationships in Aristolochiaceae. *Systematic Botany* **28**: 236-249.

Lennartsson T. 2002. Extinction Thresholds and Disrupted Plant-Pollinator Interactions in Fragmented Plant Populations. *Ecology* **83**: 3060-3072.

Liu KW, Liu ZJ, Huang L, Li LQ, Chen LJ, Tang GD. 2006. Self-fertilization strategy in an orchid. *Nature* **441**: 945-946.

MacCagnani B, Ladurner E, Santi F, Burgio G. 2003. *Osmia cornuta* (Hymenoptera, Megachilidae) as a pollinator of pear (*Pyrus communis*): fruit- and seed-set. *Apidologie* **34**: 207–216.

Mahy G, Jacquemart AL. 1999. Early Inbreeding Depression and Pollen Competition in *Calluna vulgaris* (L.) Hull. *Annals of Botany* **83**: 697-704.

Marshall DR, Weir BS. 1979. Maintenance of genetic variation in apomictic plant populations. *Heredity* **42**: 159-172.

Martius FP, Zuccarini JG. 1824. Nova genera et species. *Plantarum*. **1**: 75.

Masters MT. 1869. *Vegetable teratology*. London: Ray Society.

Murray MG. 1985. Figs (*Ficus* spp.) and fig wasps (Chalcidoidea, Agaonidae): hypotheses for an ancient symbiosis. *Biological Journal of the Linnean Society* **26**: 69-81.

Mustajärvi K, Siikamäki P, Rytönen S, Lammi A. 2001. Consequences of Plant Population Size and Density for Plant-Pollinator Interactions and Plant Performance. *The Journal of Ecology* **89**: 80-87.

Nanonechnaya OV, Sidorenko VS, Koren OG, Nesterova SV, Zhuravlev YN. 2008. Specific Features of Pollination in the Manchurian Birthwort, *Aristolochia manshuriensis*. *Biology Bulletin* **35**: 459-465.

Nebel BR, Trump IJ. 1932. *Xenia* and *metaxenia* in apples II. Genetics: nebel and trump. *Proc. N. A. S.* **18**: 356-359.

Ollerton J, Watts S. 2000. Phenotype space and floral typology: Towards an objective assessment of pollination syndromes. Scandinavian Association for Pollination Ecology honours Knut Faegri. *Det Norske Videnskaps-Akademi. I. Matematisk Naturvidenskapellige Klasse, Skrifter*, **39**: 149-150.

Ollerton J. 1996. Reconciling Ecological Processes with Phylogenetic Patterns: The Apparent Paradox of Plant Pollinator Systems. *The Journal of Ecology* **84**: 767-769.

Palacios C, González-Candelas F. 1997. Lack of genetic variability in the rare and endangered *Limoniutn cavaniliesii* (Plumbaginaceae) using RAPD markers. *Molecular Ecology* **6**: 671-675.

Pearson DL, Dressler RL. 1985. Two year study of male orchid bee (Hymenoptera: Apidae: Euglossini) attraction to chemical baits in low land south-eastern Peru. *Journal of Tropical Ecology* **1**: 37-54.

Pellmyr O, Huth CJ. 1994. Evolutionary stability of mutualism between yuccas and yucca moths. *Nature* **372**: 257-260.

Pérez F, Arroyo MTK, Armesto JJ. 2009. Evolution of autonomous selfing accompanies increased specialization in the pollination systems of *Schizanthus* (Solanaceae). *American Journal of Botany* **96**: 1168-1176.

Pérez F, Arroyo MTK, Medel R, Hershkovitz MA. 2006. Ancestral Reconstruction of flower morphology and pollination systems in *Schizanthus* (Solanaceae). *American Journal of Botany* **93**: 1029-1038.

Price MV, Campbell DR, Waser NM, Brody AK. 2008. Bridging the generation gap in plants: pollination, parental fecundity, and offspring demography. *Ecology* **89**: 1596-1604.

Proctor M, Yéo P, Lack A. 1996. *The natural history of pollination*. United Kingdom: The Bath Press, London.

Reddy MP, Sarla N, Siddiq EA. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* **128**: 9-17.

Rodigas E. 1893. *Aristolochia gigantea* Mart et Zucc. *L'Illustration Horticole*, **40**: 29.

Rulik B, Wanke S, Atthias N, Neinhuis C. 2008. Pollination of *Aristolochia pallid* Willd. (Aristolochiaceae) in the Mediterranean. *Flora*, **203**: 175-184.

Sakai S, Kato M, Inoue T. 1999. Three Pollination Guilds and Variation in Floral Characteristics of Bornean Gingers (Zingiberaceae and Costaceae). *American Journal of Botany* **86**: 646-658.

Sakai S. 2002. *Aristolochia* spp. (Aristolochiaceae) pollinated by flies breeding on decomposing flowers in Panama. *American Journal of Botany* **89**: 527-534.

Sargent RD, Ackerly DD. 2008. Plant-pollinator interactions and the assembly of plant communities. *Trends in Ecology and Evolution* **23**: 123-130.

Scott JM, Heglund PJ, Morrison ML, Haufler JB, Raphael MG, Wall WA, Samson FB. 2002. *Predicting Species Occurrences: Issues of Accuracy and Scale*. Washington: Island Press.

Sepúlveda C, El-Hani CN. 2008. Adaptacionismo versus exaptacionismo: o que este debate tem a dizer ao ensino de evolução? *Ciência e Ambiente* **36**: 93-124.

Singh MM. 2008. Foraging behaviour of the Himalayan Honeybee (*Apis cerana* F.) on flowers of *Fagopyrum esculentum* M. and its impact on grain quality and yield. *Ecoprint* **15**: 37-46.

Siqueira MF, Durigan G, De Marco Junior P, Peterson T. 2009. Something from nothing: Using landscape similarity and ecological niche modeling to find rare plant species. *Journal for Nature Conservation* **17**: 25-32.

- Steffan-Dewenter I, Münzenberg U, Bürger C, Thies C, Tschardt T. 2002.** Scale-dependent effects of landscape context on three pollinator guilds. *Ecology* **83**: 1421–1432.
- Svensson MGE, Rydell J, Töve J. 1998.** Deep flowers for long tongues. *Trends in Ecology & Evolution* **13**: 460.
- Temeles EJ, Pan IL, Brenan JL, Horwitt JN. 2000.** Evidence for Ecological Causation of Sexual Dimorphism in a Hummingbird. *Science* **289**: 68-80.
- Tepedino VJ. 1981.** Pollination Efficiency of the Squash Bee (*Peponapis pruinosa*) and the Honey Bee (*Apis mellifera*) on Summer Squash (*Cucurbita pepo*). *Journal of the Kansas Entomological Society* **54**: 359-377.
- Torres C, Cavieres LA, Muñoz-Ramírez C, Arroyo MTK. 2007.** Consequences of microclimate variation on insect pollinator visitation in two species of *Chaetanthera* (Asteraceae) in the central Chilean Andes. *Revista Chilena de Historia Natural* **80**: 455-468.
- Torres C, Galetto L. 2008.** Importancia de los polinizadores en la reproducción de Asteraceae de argentina central. *Acta Botanica Venezuelica* **31**: 473-494.
- Trujillo CG, Sérsic AN. 2006.** Floral biology of *Aristolochia argentina* (Aristolochiaceae). *Flora* **201**: 374-382.
- Warren SD, Harper KT, Booth GM. 1988.** Elevational Distribution of Insect Pollinators. *American Midland Naturalist* **120**: 325-330.
- Waser NM, Chittka L, Price MV, Williams NM, Ollerton J. 1996.** Generalization in Pollination Systems, and Why it Matters. *Ecology* **77**: 1043-1060.
- Weston PH, Perkins AJ, Entwistle TJ. 2005.** More than symbioses: orchid ecology, with examples from the Sydney Region. *Cunninghamia* **9**: 1-5.
- Wilcock C, Neiland R. 2002.** Pollination failure in plants: why it happens and when it matters. *Trends in Plant Science* **7**: 270-277.
- Wolff D, Braun M, Liede S. 2003.** Nocturnal versus diurnal pollination success in *Isertia laevis* (Rubiaceae): A sphingophilous plant visited by hummingbirds. *Plant Biology* **5**:71-78.
-

Anexos

Anexo 1: Normas para publicação na *Annals of Botany*

PREPARING THE ARTICLE FILE

(Always consult a recent issue of *Annals of Botany* for layout and style)

Text should be typed using size 12 Times New Roman or Courier, double-spaced throughout and with an approx. 25 mm margin. All pages should be numbered sequentially. Each line of the text should also be numbered, with the top line of each page being line 1. The article file should be in PC-compatible Microsoft Word - file type DOC [please make sure the "Language" is "English (U.K.)" via Tools → Language → Set Language]. RTF files are also acceptable. Please do not use the Windows Vista DOCX format: if you have created the text in this format, please save the files as RTF before submitting them. Please do *not* submit PDFs, desktop publishing files or LaTeX files. The article file should *include* a list of any figure legends but *exclude* tables and any figures themselves – these should be submitted separately. Please do *not* embed tables and images in the article file. Instead, tables and figures should each be allocated separate electronic files on your computer for later uploading as explained below under **PREPARING TABLE and FIGURE FILES, SUPPLEMENTARY INFORMATION FILES AND VIDEO FILES**.

It is NOT journal style to have footnotes within articles. Any such notes must be incorporated into the main text, for example within brackets or as a separate paragraph.

The **first page** should state the type of article (e.g. Original Article, Technical Article) and provide a concise and informative full **title** followed by the names of all authors. Where necessary, each name should be followed by an identifying superscript number (¹, ², ³ etc.) associated with the appropriate institutional address to be entered further down the page. For papers with more than one author, the corresponding author's name should be followed by a superscript asterisk*. The institutional address(es) of each author should be listed next, each address being preceded by the relevant superscript number where appropriate. A running title of not more than 75 characters, including spaces, should also be provided, followed by the e-mail address of the corresponding author. Please follow the layout used for the first page of papers published in *Annals of Botany*.

The **second page** should contain a structured **Abstract** not exceeding 300 words made up of bulleted headings. For 'ORIGINAL ARTICLES' these heading will normally be as follows:

- *Background and Aims*
- *Methods*
- *Key Results*
- *Conclusions*

Alternative bulleted headings, such as '*Background*', '*Scope*' and '*Conclusions*', are also acceptable for 'REVIEWS', 'INVITED REVIEWS', 'BOTANICAL BRIEFINGS', 'TECHNICAL ARTICLES' papers and 'VIEWPOINT' papers.

The Abstract should be followed by between three and 12 **Key words** that include the complete botanical name(s) of any relevant plant material. If many species are involved, species groups should be listed instead. Note that essential words in the title should be repeated in the key words since these, rather than the title, are used in some electronic searches. **Title**, **Abstract** and **Key words** should be self-explanatory without reference to the remainder of the paper.

The **third and subsequent pages** should comprise the remaining contents of the article text. 'ORIGINAL ARTICLES' and 'SHORT COMMUNICATIONS' will usually have the structure INTRODUCTION, MATERIALS AND METHODS, RESULTS, DISCUSSION, ACKNOWLEDGEMENTS and LITERATURE CITED followed by a list of captions to any figures.

The RESULTS section should not include extensive discussion and data should not be repeated in both graphical and tabular form. The DISCUSSION section should avoid extensive repetition of the RESULTS and *must* finish with some conclusions.

Abbreviations are discouraged *except* for units of measurement, standard chemical symbols (e.g. S, Na), names of chemicals (e.g. ATP, Mes, Hepes, NaCl, O₂), procedures (e.g. PCR, PAGE, RFLP), molecular terminology (e.g. bp, SDS) or statistical terms (e.g. ANOVA, s.d., s.e., *n*, *F*, *t*-test and *r*²) where *these are in general use*. Other abbreviations should be spelled out at first mention and all terms must be written out in full when used to start a sentence. Abbreviations of scientific terms should not be followed by a full stop. Use the minus index to indicate 'per' (e.g. m⁻³, L⁻¹, h⁻¹) except in such cases as 'per plant' or 'per pot'. If you decide that a list of abbreviations would help the reader, this should be included as an Appendix.

Units of Measurement. Use the *Système international d'unités* (SI) wherever possible. If non-SI units have to be used, the SI equivalent should be added in parentheses at first mention. For units of volume, expressions based on the cubic metre (e.g. 5 × 10⁻⁹m³, 5 × 10⁻⁶ m³ or 5 × 10⁻³ m³) or the litre (e.g. 5 µL, 5 mL, 5 L) are acceptable, but one or other system should be used consistently throughout the manuscript. Typical expressions of concentrations might be 5 mmol m⁻³, 5 µM (for 5 µmol L⁻¹), or 25 mg L⁻¹. The Dalton (Da), or more conveniently the kDa, is a permitted non-SI unit of protein mass.

Names of plants must be written out in full (Genus, species) in the abstract and again in the main text for every organism at first mention (but the genus is only needed for the first species in a list within the same genus, e.g. *Lolium annuum*, *L. arenarium*). The authority (e.g. L., Mill., Benth.) is *not* required unless it is controversial. Guidance for naming plants correctly is given in [The International Plant Names Index](#) and in *The Plant Book: a Portable Dictionary of the Vascular Plants* (1997) by D.J. Mabberley (Cambridge: Cambridge University Press. ISBN 0521-414210-0). After first mention, the generic name may be abbreviated to its initial (e.g. *A. thaliana*) except where its use causes confusion.

Any cultivar or variety should be added to the full scientific name e.g. *Solanum lycopersicum* 'Moneymaker' following the appropriate international code of practice. For guidance, refer to the ISHS [International Code of Nomenclature for Cultivated Plants](#) (2004) edited by C.D. Brickell, B. R. Baum, W. L. A. Hettterscheid, A. C. Leslie, J. McNeill, P. Trehane, F. Vrugtman, J. H. Wiersema (ISBN 3-906166-16-3).

Once defined in full, plants may also be referred to using vernacular or quasi-scientific names without italics or uppercase letters (e.g. arabis, dahlia, chrysanthemum, rumex, soybean, tomato). This is often more convenient.

Items of **Specialized Equipment** mentioned in MATERIALS AND METHODS should be accompanied by details of the model, manufacturer, and city and country of origin.

Numbers up to and including ten should be written out unless they are measurements. All numbers above ten should be in numerals except at the start of sentences. **Dates** should be in the form of 10 Jan. 1999, and **Clock Time** in the form of 1600 h.

Mathematical equations must be in proper symbolic form; word equations are not acceptable. Each quantity should be defined with a unique *single character* or symbol together with a descriptive subscript if necessary. Each subscript should also be a *single character* if possible, but a short word is permissible. For example, a relationship between plant dry mass and fresh mass should appear as $M_d = 0.006M_f^{1.461}$, where M_d is plant dry mass and M_f is plant fresh mass; and not as $DM = 0.006FM^{1.461}$.

The meaning of terms used in equations should be explained when they first appear. Standard conventions for use of *italics* only for variables should be followed: normal (Roman) font should be used for letters that are identifiers. Thus in the above example, M is the *variable quantity* of mass, the subscripts d and f are identifiers for dry and fresh respectively.

Special note regarding 'Equation Editor' and other software for presentation of mathematics. Symbols and equations that are imported into Word documents as embedded objects from other software packages are generally incompatible with typesetting software and have to be re-keyed as part of the proof-making process. It is therefore **strongly advisable** to type symbols and equations directly into MS Word wherever possible. Importing from other software should ideally be confined to situations where it is essential, such as two-line equations (i.e. where numerators and denominators cannot be set clearly on a single line using '/') and to symbols that are not available in Word fonts. This will minimize the risk of errors associated with rekeying by copyeditors.

Summary statistics should be accompanied by the number of replicates and a measure of variation such as standard error or least significance difference. Analysis of variance is often appropriate where several treatments are involved. Presentation of an abridged ANOVA table is permissible when its use illustrates critical features of the experiment.

Chemical, biochemical and molecular biological nomenclature should be based on rules of the [International Union of Pure and Applied Chemistry \(IUPAC\)](#) and the [International Union of Biochemistry and Molecular Biology \(IUBMB\)](#). Chapter 16 of *Scientific Style and Format. The CBE Manual for Authors, Editors, and Publishers 6th edn.*, by Edward J. Huth (Cambridge: Cambridge University Press. ISBN 0-521-47154-0) gives guidelines.

Sequence information. Before novel sequences for proteins or nucleotides can be published, authors are required to deposit their data with one of the principal databases comprising the International Nucleotide Sequence Database Collaboration: [EMBL Nucleotide Sequence Database](#), [GenBank](#), or the [DNA Data Bank of Japan](#) and to include an accession number in the paper. Sequence matrices should only be included if alignment information is critical to the message of the paper. Such matrices can be in colour but should not occupy more than one printed page. Larger matrices will only be printed by special agreement but may more readily be published electronically as **Supplementary Information** (see below).

Gene nomenclature. Species-specific rules on plant gene nomenclature are available for:

[maize](#);
[rice](#);
[wheat](#) and
[arabidopsis](#).

Otherwise, *Annals of Botany* adopts the following conventions for abbreviations: each gene abbreviation is preceded by letters identifying the species of origin. Lower-case italics should be used for mutant genes (e.g. *Rp-etr1*); upper-case italics (e.g. *Le-ACO1*) for wild-type genes; upright lower-case for proteins of mutated genes (e.g. Le-adh1); and upright upper-case for proteins of wild-type genes (e.g. At-MYB2). It may often be helpful to readers if the names of genes or gene families are spelled out in full at first mention.

Citations in the text. These should take the form of Felle (2005) or Jacobsen and Forbes (1999) or (Williamson and Watanabe, 1987; Rodrigues, 2002a, b) and be ordered chronologically. Papers by three or more authors, even on first mention, should be abbreviated to the name of the first author followed by et al. (e.g. Zhang *et al.*, 2005). If two different authors have the same last name, give their initials (e.g. NH Kawano, 2003) to avoid confusion. Only refer to papers as 'in press' if they have been accepted for publication in a named journal, otherwise use the terms 'unpubl. res.', giving the initials and location of the person concerned. (e.g. H Gautier, INRA, Lusignan, France, unpubl. res.) or 'pers. comm.' (e.g. WT Jones, University of Oxford, UK, 'pers. comm.')

The **LITERATURE CITED** should be arranged alphabetically based on the surname of the first or sole author. Where the same sole author or same first author has two or more papers listed, these papers should be grouped in year order. Where such an author has more than one paper *in the same year*, these should be ordered with single authored papers first followed by two-author papers (ordered first alphabetically based on the second author's surname, then by year), and then any three-or-more-author papers (in year order only). Italicized letters 'a', 'b', 'c', etc., should be added to the date of papers with the same first authorship and year.

For papers with *six* authors or fewer, please give the names of *all* the authors. For papers with *seven* authors or more, please give the names of the *first three* authors only, followed by *et al.*

Each entry must conform to one of the following styles according to the type of publication.

Books

Öpik H, Rolfe S. 2005. *The physiology of flowering plants. Physicochemical and environmental plant physiology*, 4th edn. Cambridge: Cambridge University Press.

Chapters in books

Scandalios JG. 2001. Molecular responses to oxidative stress. In: Hawkesford MJ, Buchner P, eds. *Molecular analysis of plant adaptation to the environment*. Dordrecht: Kluwer, 181-208.

Research papers

Popper ZA, Fry SC. 2003. Primary cell wall composition of bryophytes and charophytes. *Annals of Botany* **91**: 1–12.

Papers published online ahead of print

Forster MA, Ladd B, Bonser SP. 2011. Optimal allocation of resources in response to shading and neighbours in the heteroblastic species, *Acacia implexa*. *Annals of Botany*, in press. doi:10.1093/aob/mcq228.

NB include the doi number: a search for the doi will always be directed to the most recent version, so the reader will be able to find the final published paper as soon as it appears.

Online-only journals

Aizen MA, Morales C, Morales JM. 2008. Invasive mutualists erode native pollination webs. *PLoS Biology* **6**: e31. doi:10.1371/journal.pbio.0060031.

NB include the doi number after the volume and article number.

Theses

Tholen D. 2005. *Growth and photosynthesis in ethylene-insensitive plants*. PhD Thesis, University of Utrecht, The Netherlands.

Anonymous sources

Anonymous. Year. *Title of booklet, leaflet, report, etc.* City: Publisher or other source, Country.

References to websites should be structured as: **Author(s) name, author(s) initial(s). year.** *Full title of article.* Full URL. Date of last successful access (e.g. 12 Jan. 2003)

Acknowledgements. In the ACKNOWLEDGEMENTS, please be brief. 'We thank . . .' (not 'The present authors would like to express their thanks to . . .').

Funding information. Details of all funding sources for the work in question should be given in a separate section entitled 'Funding'. This should appear before the 'Acknowledgements' section.

The following rules should be followed:

- The sentence should begin: 'This work was supported by ...'
- The full official funding agency name should be given, i.e. 'the National Cancer Institute at the National Institutes of Health' or simply 'National Institutes of Health' not 'NCI' (one of the 27 substitutions) or 'NCI at NIH' ([full RIN-approved list of UK funding agencies](#))
- Grant numbers should be complete and accurate and provided in brackets as follows: '[grant number ABX CDXXXXXX]'
- Multiple grant numbers should be separated by a comma as follows: '[grant numbers ABX CDXXXXXX, EFX GHXXXXXX]'
- Agencies should be separated by a semi-colon (plus 'and' before the last funding agency)
- Where individuals need to be specified for certain sources of funding the following text should be added after the relevant agency or grant number 'to [author initials]'

An example is given here: 'This work was supported by the National Institutes of Health [P50 CA098252 and CA118790 to R.B.S.R.] and the Alcohol & Education Research Council [HFY GR667789].

Oxford Journals will deposit all NIH-funded articles in PubMed Central.

See http://www.oxfordjournals.org/for_authors/repositories.html for details. Authors must ensure that manuscripts are clearly indicated as NIH-funded using the guidelines above.

Appendix.

If elaborate use is made of units, symbols and abbreviations, or a detailed explanation of one facet of the paper seems in order, further details may be included in a separate APPENDIX placed after the LITERATURE CITED.

For more detail and information on types of files required for text, graphics and tables etc., please see the next section.

[Back to Start](#)

PREPARING TABLE FILES, FIGURE FILES, SUPPLEMENTARY INFORMATION FILES AND VIDEO FILES

Each table, figure, video and set of supplementary information should be prepared as a separate file on your computer in preparation for online submission. Towards the bottom of the first submission screen of the online submission system, you should enter the appropriate number of files you have in each category. This creates the spaces (boxes) that will accommodate the files when they are uploaded later. The files are categorized as 'Colour Figures', 'Black and White Figures', 'Tables', 'Supplemental Material' and 'Video'.

Tables. The best guide for laying out tables and diagrams are papers in a recent issue of *Annals of Botany*. Tables should be placed at the end of the main text file after the Literature Cited, and include a complete caption above the table and be numbered Table 1, Table 2 etc. according to the order in which they are first mentioned in the text. When preparing tables, adopt the 'Tables' set-up in MS Word, using one cell for each datum cluster (e.g. 12.2 ± 1.65) and avoid the use of the 'return' key. If the tables have been prepared in MS Excel, please paste them into the Word document as text, not as an object: i.e. it should be possible in Word to select and edit the text within the table.

Figures. All images (e.g. line diagrams, drawings, graphs, photographs, plates) are considered to be 'Figures'. Each figure should be in a separate file and be numbered (Fig. 1, Fig. 2 etc.) according to the order in which they are first mentioned in the text. Electron and light **photomicrographs** should have internal scale markers. **Colour images** are encouraged and printed without charge where they enhance significantly the clarity of the scientific information. **Line diagrams** will normally be black on white and boxed with inward scale markings. Use of colour in line diagrams may sometimes be agreed where this enhances clarity significantly. Use open and/or closed circles, squares and triangles for symbols in line graphs. Height and width should be chosen for either single (8.4 cm wide) or double (up to 17.3 cm wide) column reproduction. Grouping of related graphics into a single figure is strongly encouraged. When a block of illustrative material consists of several parts, each part should be labelled A, B, C, etc. and not treated as separate figures. Note that graphs and diagrams of finally accepted papers are normally redrawn by the publisher to ensure a consistent house style and should be inspected carefully by authors at the proof stage.

Simple black and white **line drawings and graphs** should be supplied as approx. 300 dpi JPG files or MS PowerPoint files. The publisher will almost always redraw all such material if the paper is accepted. More complicated drawings, such as detailed botanical illustrations will not be redrawn and should be supplied as 600 dpi JPG files. For continuous tone images (e.g. **photographs**), please supply JPG files at 300 dpi (or 600 dpi if the image is a mix of pictures and text and/or has thin lines). Keeping total files sizes down will lessen up- and downloading times. To help achieve this *all images should be submitted at approximately the physical size they would appear in the Journal*. Scaling, sizing and cropping are best carried out within image handling programs such as Adobe PhotoShop or Corel PhotoPaint. Please do not supply photographic images as PowerPoint files as these are generally of poor resolution. Note that PDF files are not acceptable. Also, please ensure that images that do NOT contain colour are saved as 'grayscale' and that any layers have been flattened – taking these steps can make the file size up to 10 times smaller. Note that a JPG file should not be repeatedly saved as this reduces quality.

Large amounts of additional information can be submitted for publication electronically as **Supplementary Information** provided that it is not essential for a basic understanding of the main paper. Supplementary material will be refereed along with the core paper. At appropriate positions in the main text authors should indicate what details are being made available, followed by the words [**Supplementary Information**] in bold and between square brackets. The online submission system provides space for supplementary information to be uploaded in "Supplemental Material" files. The appropriate number of these types of file can be selected towards the bottom of the first submission screen. Similarly, if you are including a **video** you should enter [**Supplementary Information - Video**] in bold and between square brackets at the appropriate place(s) in the text. A video can be uploaded after selecting a "Video" file on the first submission screen. The movie should be created in a widely available program such as Windows MediaPlayer. A short paragraph describing the contents of any Supplementary Information or Video should also be inserted in the main text immediately before ACKNOWLEDGEMENTS

Anexo 2: Normas para publicação na Journal for Nature Conservation

