

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL

INSTITUTO DE BIOCIEÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

Ecologia reprodutiva de *Dyckia leptostachya* Baker: uma bromélia

autoincompatível no Pantanal Sul-Mato-Grossense

Diego Finati Alves

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Gecele Matos Paggi

Coorientador: Dr. Maurício Lenzi

Campo Grande – MS

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

**Ecologia reprodutiva de *Dyckia leptostachya* Baker: uma bromélia
autoincompatível no Pantanal Sul-Mato-Grossense**

Diego Finati Alves

Dissertação apresentada como
um dos requisitos para obtenção
do grau de Mestre em Biologia
Vegetal junto ao Instituto de
Biociências.

Campo Grande – MS

2018

DEDICO

À minha família pelo amor e apoio incondicional em toda minha
vida;

À minha mãe Cláudia Andréa Finati, pelo incentivo e apoio
durante toda etapa de estudos;

À minha irmã Ana Laura, minha melhor amiga;

À minha avó amada Vera (reza sempre vó, que dá certo) e a tia
Patrícia por todo amor e carinho.

Agradecimentos

À minha orientadora Gecele Matos Paggi, pelo exemplo de seriedade no trabalho, humildade e humanidade no trato com as outras pessoas. Por me orientar desde a graduação e ter me encantado pela área da reprodução vegetal. Obrigado por ter mudado a forma como enxergo as plantas.

Aos membros da banca de qualificação por todas as contribuições, correções e questionamentos para a melhora desta dissertação. Ao programa de pós-graduação em Biologia Vegetal, por oferecer toda a logística necessária para a realização deste trabalho. Aos professores do programa que contribuíram com minha formação científica. De modo geral, também agradeço à Universidade Federal do Mato Grosso do Sul e aos demais professores que participaram da minha formação desde a graduação. Obrigado pelo ensino de qualidade, gratuito e público.

Aos demais mestres que tanto me ensinaram nesta jornada. Em especial, ao Dr. Maurício Lenzi, meu coorientador, por todas as experiências transformadoras. Obrigado por ter mudado a forma como encaro as descobertas científicas.

A CAPES pela concessão da bolsa de mestrado e a UFMS-Campus do Pantanal pelo financiamento das expedições ao campo.

Aos amigos Biólogos: Brenda Brandão, Kelly Arruda e Analice. Aos amigos que a pós-graduação uniu. Todas as risadas que compartilhamos me ajudaram a superar os desafios acadêmicos. Obrigado por preencherem minhas lembranças com tantos momentos bons, e inclusive por tornar agradáveis os não tão bons assim.

Aos meus pais, Claudia e Paulo, pelo constante incentivo em todas as minhas decisões. Por valorizarem meu trabalho e por todo amor e zelo desde sempre. A minha irmã Ana Laura, pelo amor e carinho e por sempre estar comigo. À minha tia Patrícia pelo exemplo de garra, pela alegria que nos proporciona e por me fazer sentir saudades de casa assim que pego a estrada para Araçatuba. Obrigado por todo o acolhimento que recebo de vocês.

Resumo

Dyckia leptostachya Baker é uma espécie nativa da Bolívia, Paraguai, Argentina e Brasil. No Brasil, esta espécie ocorre no Pantanal sul-mato-grossense, na cidade de Corumbá, sobre bancadas lateríticas. Esse estudo foi conduzido ao longo de um ano e meio, entre maio de 2016 e janeiro de 2018, sendo avaliadas a fenologia, a biologia floral e reprodutiva da espécie foram estudadas. *Dyckia leptostachya* floresce durante quase todo ano, com picos de floração nos meses de junho e dezembro. A antese ocorreu ao longo de todo o dia e apresentou uma duração de três dias. A espécie apresenta atributos florais associados à psicofilia. A constante visitação de *Phoebis neocyparis* confirma essa observação. Considerando os resultados dos parâmetros de fertilidade natural e da razão pólen/óvulo, conclui-se que a espécie apresenta autoincompatibilidade; contudo, com base nos experimentos de polinização manual, a espécie apresenta autocompatibilidade. Dessa forma, identificamos que a germinação de sementes deve ser considerada como um dos principais parâmetros do sucesso reprodutivo da espécie, e não apenas a frutificação, uma vez que esta não implica em viabilidade de sementes. Assim, as sementes oriundas dos experimentos de polinização cruzada e do controle tiveram as maiores taxas de germinação, corroborando com as características de autoincompatibilidade de *D. leptostachya*.

Palavras-chave: autoincompatibilidade, bancadas lateríticas, biologia reprodutiva, bromélia, germinação de sementes.

Abstract

Dyckia leptostachya Baker is a native species from Bolivia, Paraguay, Argentina and Brazil. In Brazil, in the Central region, it occurs in the Pantanal region, mostly in Mato Grosso do Sul State, specifically in Corumbá city, in areas of ironstone outcrops known as lateritic benches or “cangas”. The species blooms during almost all year round, with flowering peaks in June and December. The anthesis occurred throughout the day and lasts for three days. The species presents floral attributes associated with psychophily. The constant visitation of *Phoebis neocypris* confirms this observation. Considering the results from the parameters of natural fertility and the pollen/ovule ratio, we concluded that the species shows self-incompatibility; however, based on manual pollination experiments, the species shows self-compatibility. Thus, we identify that seed germination should be considered as one of the main parameters of the reproductive success for this species, and not only the fruit set, since it does not imply seed viability. Therefore, we observed that seeds from cross-pollination and control experiments had the highest germination rates, corroborating with the self-incompatibility characteristics of *D. leptostachya*.

Key words: Bromeliads, lateritic benches, reproductive biology, seed germination, self-incompatibility.

Sumário

1.	Introdução	8
1.1.	A família Bromeliaceae.....	8
1.2.	O gênero <i>Dyckia</i>	9
1.3.	Bancadas lateríticas e Bromeliaceae.....	9
1.4.	Fenologia.....	10
1.5.	Sistema reprodutivo.....	11
2.	Objetivo geral.....	13
2.1.	Objetivos específicos.....	13
3.	Referências bibliográficas.....	14
4.	Artigo: Ecologia reprodutiva de <i>Dyckia leptostachya</i> Baker: uma bromélia autoincompatível no Pantanal Sul-Matogrossense.....	17
	Resumo.....	19
	Abstract.....	20
	Introdução.....	21
	Material e Métodos.....	23
	Resultados.....	28
	Discussão.....	33
	Agradecimentos.....	37
	Referências.....	38
	Legendas de figuras.....	46
	Tabelas.....	47
	Figuras.....	50

1- Introdução

1.1- A Família Bromeliaceae

A família Bromeliaceae possui aproximadamente 3.000 espécies e 58 gêneros distribuídos tradicionalmente nas subfamílias Bromelioideae, Pitcairnoideae e Tillandsioideae (Luther, 2012). As bromélias são conhecidas por suas radiações adaptativas recentes, com espécies apresentando hábitos diferentes, podendo ser encontradas a partir do nível do mar até grandes altitudes, no deserto e em regiões úmidas, assim como em solos sujeitos a inundações regulares e em locais com baixa ou alta luminosidade (Benzing, 2000; Givnish et al., 2011). Espécies desta família, podem prosperar em locais com temperaturas elevadas como areias e rochas escaldantes, e também resistir a temperaturas muito baixas até próximas de 0 °C (Benzing, 2000). Bromeliaceae têm a possibilidade de operar como um subsistema ecológico, cooperando na estabilidade dos ecossistemas. Diversos animais, como por exemplo, aves, insetos e até mesmo crustáceos, fazem valer dessas plantas como zona para nidificação, resguardo ou nutrimento (Benzing, 2000).

A subfamília Pitcairnioideae possui 16 gêneros (Forzza, 2010) e aproximadamente 680 espécies (Smith & Downs, 1974). As plantas pertencentes a esta subfamília possuem hábito epífito, sendo geralmente terrestres, com raízes fibrosas e folhas dispostas em rosetas que não formam tanque (Benzing, 2000; Givnish et al., 2011). Os frutos são, em sua maioria, do tipo cápsulas deiscentes, o ovário pode ser súpero ou ínfero. As sementes apresentam apêndices pequenos, podendo ser facilmente transportadas pelo vento (Smith & Downs, 1974).

1.2- O gênero *Dyckia*

Dyckia Schult.f. é encontrado na Argentina, Bolívia, Brasil, Paraguai e Uruguai. No Brasil são encontradas 83% das espécies conhecidas, com distribuição que vai do nível do mar até 1000 m de altitude, em ambientes expostos ao sol nos domínios Mata Atlântica, Caatinga, Campos Rupestres, Restinga, Amazônia e Cerrado (<http://inct.splink.org.br>). *Dyckia* é constituído por cerca de 150 espécies (Luther et al., 2012), as quais são usualmente terrestres, xerofíticas, crescendo em solos bem drenados, ou podem ser rupícolas, sendo encontradas em diversos afloramentos rochosos, em ambientes secos e algumas vezes úmidos ou até mesmo espécies reófitas (Smith & Downs, 1974; Benzing, 2000). São plantas caracterizadas por formar rosetas com folhas coriáceas ou suculentas, com espinhos marginais bem desenvolvidos, sem a formação do tanque que acumula água (caráter típico de Bromeliaceae; Crayn et al., 2004). Apresentam inflorescência racemosa com escapo lateral, simples ou ramificado, flores predominantemente amarelas, alaranjadas, ou vermelhas, mas as cores vinho-castâneo ou esverdeada são relatadas em poucas espécies, como por exemplo *Dyckia velascana* Mez. As plantas propagam-se vegetativamente por meio de rizomas curtos ou longos (Benzing, 2000).

1.3- Bancadas lateríticas e Bromeliaceae

Os afloramentos rochosos, também conhecidos como ‘cangas’ por alguns autores, como Bigarella et al. (2007), estão difundidos pela imensidão do planeta Terra, congregados nos topos dos morros e também em distintas elevações. As bancadas lateríticas são afloramentos de ferro da era Cenozóica, mais precisamente da época Pleistocênica que se incidiu em áreas de drenagem dos morros, com solos excessivamente rasos e secos (Pott et al., 2000). Nesses ambientes a vegetação que por acaso se aloja, encontra-se em condições nada hospitalares, como os altos níveis de insolação, a amplitude

térmica, podendo chegar até 55°C, a carência de solo e penúria de água, além da ação deletéria de ventos e enxurradas (Porembski et al., 1998; Takahasi, 2010;). Em relação à vegetação sobre campos ferruginosos de Corumbá e Ladário são poucos os estudos botânicos e reprodutivos (Takahasi, 2010; Takahasi & Meirelles, 2014).

Estudos anteriores com a família Bromeliaceae na área do Maciço do Urucum (Corumbá, Mato Grosso do Sul - MS) identificaram a ocorrência de duas espécies de *Dyckia*, sendo elas: *D. leptostachya* Baker e *D. excelsa* Leme (Paggi et al., 2015; Versieux et al., 2018). A restrição ambiental limita o número de espécies estabelecidas nestes locais e pode contribuir ao isolamento reprodutivo destas populações conferindo um elevado grau de endemismo a estes ambientes (Porembski et al., 1998). Sugere-se que as condições peculiares no metabolismo destas plantas explicam a ocorrência de endemismos nos afloramentos ferríferos (Porto & Silva, 1989; Silva, 1992) e em locais com solos metalíferos (Ginocchio & Baker, 2004), onde algumas espécies de plantas poderiam, inclusive, ser utilizadas como indicadoras de jazidas de minerais (Baker & Brooks 1988, Silva 1992, Ginocchio & Baker, 2004).

Atualmente, as bancadas lateríticas pertencem a propriedades particulares e estão sujeitas à degradação ambiental como ação de fogo, pastoreio, retirada seletiva de espécimes, entre outras (Pott et al., 2000). A região está sob forte pressão antrópica para abertura de novas áreas para agricultura, extração de minério de ferro e instalação de redes elétricas (observação pessoal).

1.4- Fenologia

Os eventos fenológicos envolvem desde a queda e brotamento foliar até a floração, frutificação, dispersão e germinação de sementes, a partir dos quais são estudadas a temporalidade e a relação com forças seletivas bióticas, abióticas e filogenéticas que

podem determinar diferentes padrões (Williams-Linera & Meave, 2002). Ecossistemas tropicais possuem uma grande diversidade fenológica, o que torna o conhecimento dos eventos fenológicos de grande importância para auxiliar o entendimento da ecologia e evolução das espécies e comunidades ocorrentes nessas áreas. Os ciclos fenológicos de plantas são complexos, apresentando padrões irregulares de difícil reconhecimento, principalmente em estudos de curto prazo (Newstrom et al., 1994). Portanto, a escolha dos métodos de avaliação e representação tem especial importância, pois pode dificultar ou auxiliar no reconhecimento dos padrões fenológicos. Estudos fenológicos em florestas tropicais envolvendo em observação direta de plantas têm utilizado, em sua maioria, dois métodos de avaliação: 1. qualitativa, definindo apenas a presença ou ausência da fenofase considerada e 2. semi-quantitativa, com a aplicação de categorias de quantificação que estimam a intensidade do evento fenológico em cada indivíduo, sendo mais comum a utilização de cinco categorias de quantificação (0 a 4), com intervalo de 25% entre elas (Bencke & Morellato, 2002).

1.5 – Sistema Reprodutivo

Diversas espécies de plantas podem apresentar exclusivamente um modo de reprodução (sexual ou assexual) e um sistema de cruzamento (alogamia ou autogamia), porém o mais comum é haver os dois, um modo de reprodução e sistema de cruzamento predominante e eventos esporádicos do outro (Bodenese-Zanettini & Cavalli, 2003). As bromélias podem se propagar de forma assexuada e/ou sexuada (Benzing, 2000), onde, os estudos de biologia reprodutiva explicam a manutenção de sistemas mistos de cruzamentos em várias espécies, com taxas de autofecundação e fecundação cruzada moderadas. Este fenômeno teria a vantagem da reprodução assegurada, pela autofecundação e de evitar a

depressão por endocruzamentos, através da fecundação cruzada (Porcher & Lande, 2005; Charlesworth & Charlesworth, 2006).

Aproximadamente 80% das angiospermas são monóicas, com um indivíduo análogo dispondo de flores com estruturas reprodutivas femininas e masculinas (Proctor et al., 1996). Deste modo, a probabilidade de acontecer a autofecundação pode ser grande, o que deve ter levado as plantas a desenvolverem distintos mecanismos pautados à prevenção da autofecundação (Proctor et al., 1996). A proporção de indivíduos produzidos pela polinização cruzada e pela autopolinização são influenciadas por muitas características. A dicogamia e a hercogamia geram a alogamia para diversas espécies autocompatíveis (Benzing, 2000).

A biologia floral inclui o estudo de todas as manifestações de vida da flor, inclusive a fertilização. Neste sentido a biologia floral mescla-se com a ecologia da polinização, que engloba estudos de interação entre flores e seus visitantes/polinizadores. A compreensão do sistema reprodutivo é relevante para o entendimento da biologia reprodutiva da espécie e apoio para a ampliação de programas de melhoramento genético,

2- Objetivo geral

Estudar a fenologia e biologia floral, e o sistema reprodutivo de *Dyckia leptostachya*, buscando-se, também, associar aspectos climáticos da região de estudo aos padrões fenológicos da espécie. Aspectos da biologia floral e sistema de cruzamento preferencial da espécie foram relacionados às interações com a fauna de visitantes florais.

2.1- Objetivos Específicos

- Determinar o padrão fenológico reprodutivo da espécie;
- Descrever a morfologia floral e avaliar o investimento da espécie na oferta de recursos florais, como produção de pólen e néctar;
- Avaliar a fertilidade da espécie, visando determinar seu sucesso reprodutivo natural comparativamente aos resultados dos testes de polinização;
- Caracterizar funcionalmente o sistema reprodutivo sexual por meio de observações e testes de polinização *in loco*;
- Inventariar e identificar os visitantes florais, buscando descrever o comportamento forrageiro dos potenciais polinizadores.

3- Referências Bibliográficas

- Bencke C.S.C. & Morellato L.P.C. Comparação de métodos de avaliação fenológica. Revista Brasil. Bot., v.25, n.3, p.269-275, set. 2002.
- Benzing, D.H. 2000. Bromeliaceae: profile of an adaptive radiation. Cambridge: Cambridge University Press, p.690.
- Bodanese-Zanettini, M.H. & Cavalli, S.S. 2003. Variabilidade genética em função do modo de reprodução. In: Freitas, L.B. & Bered, F. (eds) Genética e Evolução Vegetal. Porto Alegre: Editora UFRGS, v.1, p.177-188.
- Charlesworth, B. & Charlesworth, D. 2006. The evolutionary genetics of sexual systems in flowering plants, v.205, p.513-530.
- Crayn, D.M., Winter, K. & Smith, J.A.C. 2004. Multiple origins of crassulacean acid metabolism and the epiphytic habit in the Neotropical family Bromeliaceae. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.101, p.3703-3708.
- Forzza RC, et al. 2010b. Introdução. Lista de Espécies da Flora do Brasil. Rio de Janeiro Botanical Garden. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010> (Acessado em 18 de dezembro de 2017).
- Givnish, T.J., Barfuss, M.H.J., Van Ee, B., Riina, R., Schulte, K., Horres, R., Gonsiska, P.A., Jabaily, R.S., Crayn, D.M., Smith, J.A.C., Winter, K., Brown, G.K., Evans, T.M., Holst, B.K., Luther, H., Till, W., Zizka, G., Berry, P.E., Sytsma, K.J., 2011. Adaptive radiation and diversification in Bromeliaceae: insights from a 7-locus plastid phylogeny. Am. J. Bot., v.98, p.872-895.

Luther, H.E. 2012. An alphabetical list of Bromeliad binomials.

http://www.selby.org/research/bic/Binom_2000_Alpha.pdf (Acessado em 9 de janeiro de 2018).

Paggi, G.M., Louzada, R.B., Ishii, I.H., Takahasi, A., Arruda, R.C.O. & Lorenz-Lemke, A.P. 2015. Rediscovering *Dyckia excelsa* (Bromeliaceae) in Mato Grosso do Sul, Brazil: taxonomy, geographic distribution and notes on leaf anatomy. *Systematic Botany*, v.1, p. 129-135.

Porcher, E. & Lande, R. 2005. The evolution of self-fertilization and inbreeding depression under pollen discounting and pollen limitation. *Journal of Evolutionary Biology*, v.18, p.497-508.

Porembski, S., Martinelli, G., Ohlemüller, R. & Barthlott, W. 1998. Diversity and ecology of saxicolous vegetation mats on inselbergs in the Brazilian Atlantic rainforest. *Diversity and Distributions*, v.4, p.107-119.

Proctor, M., Yeo, P., Lack, A. 1996. The natural history of pollination. London, Harper Collins Publishers, 479p.

Pott, A., Silva, J.S.V., Salis, S.M., Pott, V.J. & Silva, M.P. 2000. Vegetação e uso da terra. In: JSV. Silva (Ed.). Zoneamento ambiental da Borda Oeste do Pantanal: Maciço do Urucum e Adjacências. Embrapa, Brasília, p.111-131.

Smith, L.B. & Downs, R.J. 1974. Pitcairnoideae (Bromeliaceae). *Flora Neotropica*. Monograph, v.14, part 1, p.1-658.

Takahasi, A. 2010. Ecologia da vegetação em bancadas lateríticas em Corumbá, MS. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.

Takahasi, A. & Meirelles, S. T. 2014. Ecologia da vegetação herbácea de bancadas lateríticas (cangas) em Corumbá, MS, Brasil. *Hoehnea*, v.41, n.4, p.515-528.

Versieux, L.M., Coffani-Nunes, J.V., Paggi, G.M. & Costa, A.F. 2018. Checklist of

Bromeliaceae from Mato Grosso do Sul, Brazil. *Iheringia Série Botânica*, v.73, p.163-168.

Williams-Linera, G. & Meave, J. 2002. Patrones fenológicos. In: Guariguata, M.R. & Katan, G.H. *Ecología y conservación de bosques neotropicales*. Ediciones LUR, San Jose, p. 408-431.

4- Artigo

Ecologia reprodutiva de *Dyckia leptostachya* Baker: uma bromélia autoincompatível no Pantanal Sul-Mato-Grossense

Artigo a ser submetido à revista Brazilian Journal of Botany

**Ecologia reprodutiva de *Dyckia leptostachya* Baker: uma bromélia
autoincompatível no Pantanal Sul-Mato-Grossense**

Diego Finati Alves^{1, 2}, Déborah Cainelli², Maurício Lenzi², Gecele Mato Paggi^{1, 2}

¹ Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Instituto de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Campo Grande, MS, Brasil.

² Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, *Campus* do Pantanal, Laboratório de Genética, Corumbá, MS, Brasil.

Autor para correspondência: Gecele Matos Paggi gecele.paggi@ufms.br

Resumo

Dyckia leptostachya Baker é uma espécie nativa da Bolívia, Paraguai, Argentina e Brasil. No Brasil, esta espécie ocorre no Pantanal sul-mato-grossense, na cidade de Corumbá, sobre bancadas lateríticas. Esse estudo foi conduzido ao longo de um ano e meio, entre maio de 2016 e janeiro de 2018, sendo avaliadas a fenologia, a biologia floral e reprodutiva da espécie foram estudadas. *Dyckia leptostachya* floresce durante quase todo ano, com picos de floração nos meses de junho e dezembro. A antese ocorreu ao longo de todo o dia e apresentou uma duração de três dias. A espécie apresenta atributos florais associados à psicofilia. A constante visitação de *Phoebis neocypris* confirma essa observação. Considerando os resultados dos parâmetros de fertilidade natural e da razão pólen/óvulo, conclui-se que a espécie apresenta autoincompatibilidade; contudo, com base nos experimentos de polinização manual, a espécie apresenta autocompatibilidade. Dessa forma, identificamos que a germinação de sementes deve ser considerada como um dos principais parâmetros do sucesso reprodutivo da espécie, e não apenas a frutificação, uma vez que esta não implica em viabilidade de sementes. Assim, as sementes oriundas dos experimentos de polinização cruzada e do controle tiveram as maiores taxas de germinação, corroborando com as características de autoincompatibilidade de *D. leptostachya*.

Palavras-chave: autoincompatibilidade, bancadas lateríticas, biologia reprodutiva, polinizadores, sistema reprodutivo misto.

Abstract

Dyckia leptostachya Baker is a native species from Bolivia, Paraguay, Argentina and Brazil. In Brazil, in the Central region, it occurs in the Pantanal region, mostly in Mato Grosso do Sul State, specifically in Corumbá city, in areas of ironstone outcrops known as lateritic benches or “cangas”. The species blooms during almost all year round, with flowering peaks in June and December. The anthesis occurred throughout the day and lasts for three days. The species presents floral attributes associated with psychophily. The constant visitation of *Phoebis neocypris* confirms this observation. Considering the results from the parameters of natural fertility and the pollen/ovule ratio, we concluded that the species shows self-incompatibility; however, based on manual pollination experiments, the species shows self-compatibility. Thus, we identify that seed germination should be considered as one of the main parameters of the reproductive success for this species, and not only the fruit set, since it does not imply seed viability. Therefore, we observed that seeds from cross-pollination and control experiments had the highest germination rates, corroborating with the self-incompatibility characteristics of *D. leptostachya*.

Key words: lateritic benches, mixed mating system, pollinators, reproductive biology, self-incompatibility.

1 Introdução

O sucesso reprodutivo de populações naturais de plantas, ou mesmo de comunidades pode estar ligado às ocorrências fenológicas, podendo indicar a sua sobrevivência. Contudo, além de fatores abióticos, como temperatura, umidade, fotoperíodo e precipitação, os elementos bióticos, abrangendo herbivoria, competição, polinização e dispersão, ainda podem servir como influentes seletivos aos padrões fenológicos analisados (Sakai et al. 2005).

As Bromeliaceae oferecem algumas estratégias que podem beneficiar a alogamia, como exemplo, a protoginia que é a maturação do gineceu antes do androceu, ou também a protandria que é a maturação do androceu antes do gineceu. Além disso, a consignação do tempo em que o estigma continuar a ser receptivo é um considerável parâmetro, sobretudo em experimentos que empregam a polinização artificial; a receptividade do estigma é o período caracterizado por alta atividade enzimática nessa fase de desenvolvimento (Dafni & Maués 1998). Além destas estratégias, a fecundação cruzada é reforçada pela incompatibilidade encontrada em muitas espécies de bromélias (Benzing 2000). Confia-se que a troca de grão de pólen de uma planta, para fecundar o estigma de outra planta seja mais ‘lucrativa’, pelo fato de originar uma progênie com maior variabilidade, porquanto que favorece a diversidade genética. Em contrapartida, a polinização de uma planta com seu próprio grão de pólen assegura a reprodução uma vez que a fecundação cruzada é imprópria ou inexistente (Wendt et al. 2002).

Em Bromeliaceae, a autocompatibilidade e a autoincompatibilidade podem coexistir dentro de um mesmo gênero (Benzing 2000). Em Pitcairnoideae, a agamospermia foi observada em *Pitcairnia corcovadensis* Wawra e *P. flammea* lindl.

(Wendt et al., 2002). No gênero *Dyckia* a autocompatibilidade foi relatada em *Dyckia brevifolia* Baker, a qual também produziu sementes por agamospermia (Rogalski et al. 2009); a autoincompatibilidade foi relatada como modo preferencial de cruzamento em *D. ibiramensis* Reitz (Vosqueritchian e Buzato 2006) e *D. tuberosa* (Vell.) Beer (Hmeljevski et al. 2007).

O conhecimento de aspectos sobre a biologia da polinização é fator importante para a compreensão da dinâmica das comunidades vegetais, pois representam uma importante ferramenta para o entendimento da organização espaço-temporal dos recursos disponíveis no ambiente aos animais associados (Piacentini & Varassin 2007).

Bromeliaceae constitui uma das principais famílias responsáveis pela oferta e manutenção de recursos alimentares ao longo do ano para uma diversificada fauna de polinizadores, em especial beija-flores. No caso dessas aves, as espécies de bromélias constituem seu mais importante recurso alimentar na Floresta Atlântica do sudeste brasileiro e em certas áreas, chegam a representar mais de 30% de seus recursos alimentares (Sazima et al. 1996; Buzato et al. 2000).

Os insetos são considerados responsáveis pela polinização da maioria das plantas tropicais e a entomofilia, mediada principalmente por abelhas e borboletas, é uma das principais síndromes de polinização observadas em espécies de Bromeliaceae, como descrito por Kaheler et al. (2005) e Varassin et al. (2000), que apresentou dados para espécies da Mata-Atlântica. Além disso, Wiesbauer (2008) estudo a biologia reprodutiva e os polinizadores em *Dyckia distachya*, no Rio Grande do Sul. Quando comparadas à outras espécies de plantas, as bromélias produzem um alto teor de açúcar em seu néctar, como apontam alguns estudos, o que vêm despertando interesse de muitos pesquisadores da área (Buzato et al. 2000; Krömer et al. 2008), e demonstra a

importância da família como uma fonte importante de recursos para a comunidade de polinizadores.

De acordo com o Ministério do Meio ambiente, apenas 4,4% do Pantanal é protegido por Unidades de Conservação, portanto este estudo vem colaborar para a ecologia e conservação da flora presente nas bancadas lateríticas, buscando comparar através de gráficos, os padrões fenológicos e reprodutivos da espécie *Dyckia leptostachya* e o seu clima local. Buscou-se, também, associar aspectos da biologia floral e sistema de cruzamento preferencial da espécie às interações com a fauna visitante floral.

2 Material e Métodos

Espécie de estudo - *Dyckia leptostachya* Baker (1884) é uma bromélia com distribuição relativamente ampla, ocorrendo no sudeste da Bolívia, nordeste da Argentina, Paraguai, nos Estados de Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Minas Gerais e na região sul do Brasil (Smith e Downs 1974; Reitz 1983). É uma erva perene, terrestre, também conhecida como “gravateirinho”, atinge cerca de 1,0 a 1,5 m com o escapo floral. A época de floração ocorre de abril a maio e de outubro a dezembro, com inflorescências simples ou com poucos ramos e flores vermelho-alaranjadas (Smith e Downs 1974; observação pessoal; Figura 1) e o período de frutificação é de dezembro a fevereiro. *Dyckia leptostachya* é utilizada como ornamental e também pode ser utilizada como forrageira eventual, principalmente a sua rebrota após queimadas, devido a sua reprodução vegetativa; é uma espécie bastante tolerante ao fogo, ocorrendo na borda de matas, em ambientes pouco ou não alagáveis e em solos arenosos (Pott e Pott 1994).

Área de estudo - As populações foram estudadas e coletadas na área do Planalto Residual do Urucum, conhecido também como Maciço do Urucum, mais precisamente na Fazenda São João ($19^{\circ}03'45''S$ e $57^{\circ}41'15''O$) e no Parque Natural Municipal de Piraputangas ($19^{\circ}17'1,74''S$, $57^{\circ}37'11,73''O$) (Figura 2) ao sul das áreas urbanas das cidades de Corumbá e Ladário, MS. A região se caracteriza pela mata semidecídua dos morros e pela vegetação de bancada laterítica (afloramentos rochosos ferruginosos), além de matas de galeria, associadas aos cursos d'água dos morros Rabicho e Urucum (Takahasi 2010). O clima da cidade de Corumbá é do tipo AWA, segundo a classificação de Koopen, condizendo com um clima tropical megatérmico, com verões chuvosos e invernos secos (Soriano 2000). A precipitação média anual é de 1070mm e a temperatura média anual é de 25,1 graus Celsius, oscilando entre 21,4 e 25,1 graus Celsius (Soriano 2000).

Fenologia reprodutiva - As observações e avaliações fenológicas foram realizadas mensalmente entre maio de 2016 e janeiro de 2018. As fenofases reprodutivas foram determinadas pelos seguintes critérios de acordo com Bencke e Morellato (2002): ausência ou presença de cinco fenofases (escapo floral/inflorescência jovem; botão floral; flores abertas; frutos imaturos e frutos maduros) foi monitorada e avaliada de forma quantitativa, onde as observações e avaliações foram realizadas de forma direta, em 50 indivíduos em cada população, totalizando assim 100 indivíduos. Os agrupamentos de indivíduos marcados estavam espaçados por no mínimo 15m de distância. A classificação dos padrões fenológicos de floração seguiu Gentry (1974) e Newstrom et al. (1994). Os dados mensais sobre a precipitação total e temperatura média foram coletados no Banco de Dados Meteorológicos (INMET) a partir das

coordenadas geográficas, para serem associados com a fenologia de *Dyckia leptostachya*.

Biologia floral – Característica floral - Os estudos relacionados às síndromes de polinização foram determinados em 50 inflorescências de ambas populações que foram marcadas e analisadas *in situ*. A síndrome floral foi caracterizada seguindo-se o proposto por Faegri e van der Pijl (1979). Para as avaliações fenológicas foram considerados: morfologia e coloração do escapo floral, das flores, brácteas e das inflorescências.

Característica da antese – Ao longo de todo o período de floração de *D. leptostachya* da espécie, foram marcados 50 botões de indivíduos diferentes, em pré-antese, para determinar o horário de abertura das flores, número de flores por inflorescência, número de flores abertas ao dia e duração da antese.

Receptividade do estigma - A receptividade estigmática foi testada quimicamente adaptando-se a técnica proposta por Zeisler (1938), com peróxido de hidrogênio a 10%. Foram utilizadas flores ($n= 24$) em diferentes intervalos de tempo ($n= 8$) desde o início da antese (7h), seis horas depois do período de antese (13h), 12 horas após a antese (19h), 24 horas após a antese (7h), 36 horas após a antese (19h), 48 horas após a antese (7h), 60 horas após a antese (19h), até 72 horas após a abertura da flor (7h), para cada intervalo de tempo foram utilizadas 3 flores da espécie. Cada estigma foi utilizado apenas uma vez para a análise da receptividade, portanto, foram utilizadas duas flores para cada intervalo.

Quantificação polínica e ovariana - Para a quantificação dos grãos de pólen de *Dyckia leptostachya*, foram analisadas cinco flores. Foram retiradas aleatoriamente quatro anteras por flor e armazenadas individualmente em microtubos de 1ml. Estas

foram maceradas e diluídas. Posteriormente, foi retirada uma amostra de 1,5 μ l de cada flor amostrada, totalizando quatro repetições por flor. Cada amostra foi colocada em uma lâmina e os grãos de pólen foram contados sob microscópio óptico (100X). A quantidade de grãos de pólen de cada antera foi estimada conforme Petri (1976), e o número de grãos de pólen por flor foi estimado através da multiplicação do número médio de grãos de pólen por antera pelo número de anteras por flor. O número de óvulos foi determinado a partir de cinco flores. Os carpelos foram cortados longitudinalmente e analisados em estereomicroscópio (16X), sendo contados o número de óvulos por loco e por flor. Foram calculados a média e o desvio padrão para o número de óvulos por loco e por flor. A razão pólen/óvulo (P/O) foi calculada de acordo com Cruden (1977).

Produção de néctar - Para avaliar o efeito da produção do néctar foram marcadas 24 flores (seis indivíduos), sendo realizadas medições (início da antese, 10, 24, 34, 48 e 58 horas) no primeiro, segundo e terceiro dia de antese respectivamente. Também foram marcadas 10 flores como controle, onde a remoção do néctar foi feita somente no final da antese. Em todos os casos foram utilizados microcapilares de vidro (5 μ l) e a transformação do volume de néctar de centímetros para microlitros foi feita através de regra de três simples. A concentração de açúcar total no néctar foi avaliada com a utilização de um refratômetro portátil, com escalas de zero a 50 graus BRIX. Para análise dos dados do volume e concentração do néctar foram utilizadas estatísticas descritivas (média, desvio padrão e intervalo de confiança).

Fertilidade Natural - O sucesso reprodutivo em condições naturais (sem qualquer tipo de manipulação) foi avaliado em 52 inflorescências em ambas populações, através de quantificação e da estimativa dos seguintes parâmetros: 1) potencial reprodutivo (número total de flores produzidas/indivíduo); 2) taxa de frutificação (fração de flores

que se desenvolvem em frutos maduros); 3) número de sementes produzidas/fruto. A taxa de frutificação foi baseada na contagem dos frutos maduros que produziram sementes ($n= 52$). O número de sementes foi determinado a partir dos 52 frutos coletados. Posteriormente os dados foram

Biologia reprodutiva – Os sistemas de cruzamento foram investigados em campo. Em uma mesma inflorescência foram conduzidos diferentes tratamentos para cada flor; cada flor recebeu um dos seguintes tratamentos: 1) autopolinização espontânea: botões florais em pré-antese foram ensacados com saco de papel encerados e não mais manipulados; 2) geitonogamia: flores em pré-antese foram ensacadas e na antese polinizadas com pólen de flores da mesma planta com auxílio de um pincel; 3) polinização cruzada manual: flores em pré-antese foram emasculadas, e no dia seguinte, na antese, foram polinizadas manualmente com pólen exógeno, obtido de flores de plantas de outros agrupamentos; 4) condições naturais (livre): botões florais foram marcados e as flores não sofreram nenhum tipo de manipulação; 5) agamospermia: flores emasculadas e ensacadas. Para cada tratamento foram registradas as taxas de frutificação e de produção de sementes (número de frutos formados dividido pelo número de flores testadas e número de sementes por fruto). Os índices de autogamia (AI: “autogamy index”) e de autoincompatibilidade (ISI: “self-incompatibility index”) foram estimados segundo Lloyd e Schoen (1992), sendo o ISI calculado como a porcentagem da frutificação produzida pela autopolinização manual dividido pela porcentagem de frutificação produzida pela polinização cruzada manual e o AI calculado pela divisão da porcentagem de frutificação produzida pela autopolinização espontânea pela porcentagem de frutificação produzida pela polinização cruzada manual. A fim de

verificar, se haveria significância das às taxas de frutificando entre os testes de polinização, usou-se o teste Kruskal-Walis (não paramétrico).

Germinação de sementes - Os testes de germinação foram conduzidos com sementes oriundas dos testes de polinização que não estavam danificadas e nem com sinais de predação. Foram coletadas 150 sementes para cada tratamento de polinização, totalizando 750 amostras. Em seguida as sementes foram realocadas em doze placas sob papel germitest umedecido com água destilada, posteriormente levadas para germinação, com fotoperíodo de 16 h e temperatura de aproximadamente $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. A avaliação da germinação foi realizada em censos semanais durante três semanas. Foram consideradas germinadas as sementes que apresentavam a protrusão da radícula.

Visitantes Florais - As observações dos visitantes florais foram feitas durante 10 dias alternados em ambas as áreas de estudo, totalizando 30 horas de observações. Durante as visitas, foram registrados o período, a frequência e o comportamento dos visitantes florais. Ainda de acordo com o comportamento das visitas, os visitantes florais foram classificados como polinizadores ou pilhadores (Proctor et al. 2006). Firmamos aqui a importância de se observar e identificar os visitantes florais em campo para determinar os potenciais polinizadores, deixando o embasamento teórico das síndromes de polinização, apenas para sustento ou segundo plano.

3 Resultados

Fenologia reprodutiva - *Dyckia leptostachya* apresentou floração durante quase todo ano, com interrupção no mês de setembro. A maior produção de flores foi constatada no mês de junho e dezembro, considerados os picos de floração da espécie. A frutificação

ocorre logo em seguida, a partir do final do mês de junho e início de julho, e final do mês de dezembro e início do mês de janeiro, respectivamente (Figura 2). Com relação à duração da floração, a espécie mostra ter padrão subanual (com mais de uma ocorrência de floração por ano), segundo os padrões estabelecidos por Newstrom et al. (1994). Em uma mesma inflorescência ocorreu a sobreposição das fenofases (botões, flores abertas, frutos). O número de flores abertas por dia em cada indivíduo variou de dois a quatro, em média 2,6 ($s \pm 0,8$; $n= 50$) com disponibilidade “steady state” (regular) de flores, segundo Gentry (1974).

Biologia Floral – Morfologia floral - *Dyckia leptostackya* apresenta em média 8,4 flores pediceladas por inflorescência, de formato tubular, medindo em média 2,4cm (desvio padrão $\pm 1,2$; $n= 30$) de comprimento e coloração vermelho alaranjada. Cada flor constitui-se de um perianto formado por três sépalas vermelho alaranjadas e por três pétalas vermelho alaranjadas, de forma imbricada, ao qual se constitui um tubo funcional, seis estames, e um gineceu trilocular. As flores são inodoras. A espécie emite um escapo floral por roseta, de coloração verde na parte basal, passando pela coloração alaranjada entre o meio, e chegando a coloração vermelho acentuado no ápice do escapo, medindo em média 75,8cm (desvio padrão $\pm 4,6$; $n= 30$).

Características da antese - A ordem de abertura das flores ocorre no sentido da base para o ápice da inflorescência. A espécie apresentou antese diurna entre 7h e 8h da manhã. O período de disponibilidade da flor (tempo em que a flor permanece aberta, disponível aos visitantes, desde sua antese até a senescência) foi de aproximadamente 72h, sendo que suas flores permanecem abertas durante todo o período de antese. A deiscência das anteras ocorreu minutos antes do estigma tornar-se receptivo, caracterizando assim uma breve dicogamia protândrica. A fase final de antese inicia-se

às 7h do terceiro dia de antese quando as flores começam a fechar, contorcendo as pétalas semelhantes à fase de botão. Às 19h do terceiro dia as flores já se encontram totalmente fechadas, caracterizando o fim da antese. As flores murchas permanecem em média, oito dias no escapo floral.

Receptividade do estigma - O estigma localiza-se próximo aos estames, na porção central do tubo da corola. O estigma, conduplicado-espiral, elipsóide que ligeiramente excede as anteras, tornou-se receptivo às 7h do segundo dia de antese floral (após 24h de abertura da flor), permanecendo assim até às 7h do terceiro dia de antese floral (após 48h da abertura da flor). (Tabela 1)

Quantificação polínica e ovariana – A razão pólen/óvulo de *Dyckia leptostachya* revelou que a espécie disponibiliza, por flor, cerca de 14.000 grãos de pólen para um único óvulo, e possui em média $74 \pm 6,5$ ($n= 20$) óvulos por flor, indicando que a espécie é xenogâmica obrigatória de acordo com Cruden (1977) (Tabela 2).

Produção de néctar - O néctar produzido por *Dyckia leptostachya*, fica acumulado na base da corola e pode ser acessado através de passagens entre os filamentos dos estames. Já no primeiro dia de antese floral há uma diminuição no volume de néctar ao entardecer, passando de $13,4 \pm 2,51\mu\text{l}$ em média (início da antese) para $10,3 \pm 2,33\mu\text{l}$ (após 6h do início da antese). No início do segundo dia há um acúmulo de néctar (24 horas depois do início da antese), chegando a sua maior produtividade de néctar, $16,2 \pm 2,15\mu\text{l}$ em média. O volume médio de néctar potencial no primeiro dia de abertura da flor, não apresentou diferenças significativas ($t = -1,03$; $P > 0,05$) entre o início da antese floral até 6h depois da antese. Contudo, foi detectada diferença significativa ($t = 3,01$; $P < 0,05$), entre o período de 6h após a antese floral e o início do segundo dia de abertura floral (Figura 3). Em seguida ocorreu uma diminuição no volume à medida que a flor vai envelhecendo e às 58 horas do terceiro dia as flores não produziram mais

néctar (Figura 3), sendo que muitas já tinham senescido. O volume de néctar produzido entre flores de primeiro, segundo e terceiro dia (ao qual nomeamos de controle) obtiveram o acúmulo médio de $(17,9 \pm 2,3\mu\text{l})$. A concentração de açúcar no néctar foi proporcional com o volume produzido, tendo em média $28,1 \pm 2,47$ °Brix, com 24 horas após o início da antese (7h do segundo dia), havendo decréscimo dessa concentração conforme o volume do néctar diminuía (Figura 3).

Fertilidade Natural - *Dyckia leptostachya* produz em média 16 flores por inflorescência ($\pm 5,4$; $n= 20$). Foi observada uma taxa de formação de frutos em relação ao número de flores de 44%, considerada moderada, sendo que cada inflorescência produz em média 7 frutos por inflorescência (± 3 ; $n= 20$). O número médio de sementes por fruto foi de 70 ($\pm 7,6$; $n= 20$)

Biologia Reprodutiva – Testes de polinização - *Dyckia leptostachya* apresentou formação de frutos em todos os tratamentos de polinização manual: polinização cruzada (70%) foi o mais elevado quando comparadas aos tratamentos de autopolinização espontânea (35%) e autopolinização manual (25%) (Tabela 3). Os valores obtidos para os índices de autoincompatibilidade e autogamia, ambos acima de 0,3 (ISI = 0,36; AI = 0,5), indicam que a espécie é parcialmente autocompatível e autógama.

O teste Kruskal-Walis (não paramétrico) nos indica que, comparada a taxa de frutificação do teste de Polinização Cruzada (PC), com a taxa de frutificação do teste de Agamospermia, temos uma amostra significativa ($P=0,0093$), assim como quando comparadas as taxas de frutificação entre os testes de Polinização Livre (PL) e Agamospermia ($P=0,0078$). Todas as outras comparações entre as taxas de frutificação dos testes reprodutivos amostraram padrões não significativos ($P>0,01$).

Germinação de sementes - A espécie apresenta frutos do tipo cápsula, com coloração escura e possuem sementes com apêndices inteiros. Algumas sementes germinaram logo na primeira semana ($n=67$) e ao fim de 21 dias todas as sementes que não foram contaminadas com fungos e/ou bactérias haviam germinado ($n=244$). O número médio de sementes por fruto no tratamento de polinização livre foi de 102, enquanto que o número médio de sementes germinadas no tratamento de polinização cruzada foi de 132. Contudo, em todos os testes de polinização houve germinação, com diferenças entre os tratamentos, onde o tratamento de autopolinização manual obteve uma taxa de germinação de 2%, o tratamento de polinização cruzada 88%, e o tratamento de agamospermia de 1,33% (Tabela 3)

Sucesso reprodutivo entre populações - O número médio de flores de *Dyckia leptostachya* por planta no Parque Municipal Piraputangas foi $16 \pm 4,2$, enquanto na Fazenda São João foi $3 \pm 1,8$, diferindo estatisticamente ($t = 15,032; P < 0,0001$); e o número médio de frutos por planta no Parque Municipal Piraputangas foi 4 ± 3 , enquanto na Fazenda São João foi 1 ± 1 , também diferindo estatisticamente ($t = 5,533; P < 0,0001$). A taxa de frutificação no Parque Nacional do Piraputangas foi de 25%, enquanto que na Fazenda São João foi de 33,33%.

Visitantes Florais - Foram observadas três espécies de visitantes florais para a espécie em estudo, incluindo borboletas (Lepidoptera), beija-flores (Trochiliformes) e formigas (Hymenoptera). Houve o predomínio de borboletas, as quais visitavam as flores sistematicamente passando de uma flor para outra, tocavam os órgãos reprodutivos das flores com as patas e realizavam visitas sistemáticas às flores em diferentes inflorescências, visitando mais de uma inflorescência no mesmo local. A espécie apresenta atributos florais associados à psicofilia, como: antese diurna, odor fraco e agradável, flores com cores vibrantes (no caso vermelho-alaranjadas), néctar

escondido em tubos estreitos, flores eretas e radiais. Todos os beija-flores avistados realizaram visitas rápidas, passando por poucas flores disponíveis, em uma mesma sequência em cerca de um minuto. Além destes visitantes florais foram observadas diversas formigas (Hymenoptera – Formicidae) predando as flores, herbivorando parte da corola e antera das flores.

4 Discussão

Fenologia reprodutiva

O padrão de floração subanual (Newstrom et al. 1994) em nível populacional, apresentado por *D. leptostachya* é comum em espécies de Bromeliaceae (Araújo et al. 1994; Sazima et al. 1996; Martinelli 1997; Siqueira-Filho e Machado 2001; Canela e Sazima 2003), assim como constatado em outra espécie do gênero, *D. tuberosa*.

Dyckia leptostachya apresentou frutos maduros tanto no mês mais seco do ano (julho), como também no mês mais chuvoso do ano (janeiro), ao contrário do observado por Tagliati (2012) para diversas espécies de Bromeliaceae, as quais a frutificação coincide apenas com o período chuvoso, padrão também encontrado por Marques & Lemos Filho (2008), e contrapondo também com Buzato (2006), que observou que *Dyckia tuberosa* floresce e frutifica apenas na estação seca. Dada fenologia, feita até o presente momento em apenas duas populações de *Dyckia leptostachya* e localizadas próxima, com os mesmos fatores abióticos, impede uma comparação mais aprofundada quanto ao padrão fenológico entre diferentes populações dessa espécie. Resultado este diferente de outras espécies da mesma família, em que fornecem o seu ‘boom’ florístico ou na estação mais seca, ou na estação chuvosa. Futuros estudos poderão comprovar

essa indagação, se *Dyckia leptostachya* fornece picos de floração e frutificação nas extremidades climáticas, para garantir seu sucesso reprodutivo independentemente do clima, uma vez que a mesma é residual de uma área de solo ferruginoso, com temperaturas extremas.

Biologia floral

Dyckia leptostachya possui antese diurna com duração de três dias. De acordo com Gentry (1974) *Dyckia leptostachya* possuí disponibilidade regular como estratégia de floração (padrão ‘steady-state’), uma vez que produz poucas flores em antese por dia e a duração da sua floração é relativamente longa. Este padrão, onde o período de floração é relativamente longo, pode servir de vantagem para os polinizadores, tendo em vista que as flores proporcionam recursos quase que o ano todo, dependendo da espécie e da população. O padrão de abertura floral de *Dyckia leptostachya* ocorre no sentido basal para o apical do escapo floral, esta característica também pode ser observada em outros estudos com *Dyckia*, como em *D. brevifolia* Baker (Rogalski 2009).

A razão pólen/ovulo (14.103 grãos de pólen para um único óvulo) classifica *Dyckia leptostachya* como uma espécie xenogâmica obrigatória (Cruden 1977), diferindo da maioria das espécies de *Dyckia* já estudadas, como é o caso de *D. brevifolia*, classificada como xegogâmica facultativa (Rogalski 2007). De acordo com Proctor et al. (1996), pode-se afirmar que em sua totalidade, sistemas de reprodução autoincompatíveis são imperfeitos, incidindo algum grau de autopolinização.

Biologia reprodutiva

A espécie apresentou formação de frutos em todos os tratamentos de polinização manual (Tabela 4), o que poderia sugerir que a espécie é autocompatível. Houve diferenças

entre os testes de polinização? Não encontrei a estatística! Porém, as taxas de germinação foram significativamente diferentes ($t= 15,918$; $p < 0,0001$) (Tabela 3). Portanto, os resultados sugerem que *D. leptostachya* apresenta algum tipo de sistema de autoincompatibilidade em nível esporofítico.

A autoincompatibilidade também seria um meio de evitar a geitonogamia, isto é, a polinização entre flores de uma mesma planta e clones, fenômeno que ocorre em espécies que apresentam várias flores abertas ao dia em uma única inflorescência e propagação vegetativa, como *D. ibiramensis* (Hmeljevski 2007).

Sustentando a baixa germinação das sementes geradas através de autopolinização e agamospermia, apesar de ter ocorrido formação de frutos e sementes, pode indicar que *D. leptostachya* possui mecanismos eficientes de autoincompatibilidade. Tendo como exemplo os resultados de *Dyckia leptostachya*, nota-se a necessidade de avaliar a germinação de sementes a fim de verificar a viabilidade das sementes oriundas dos testes de polinização manual. Definir o sistema reprodutivo de uma espécie com base apenas na avaliação de frutos e sementes é algo inseguro. A partenocarpia é um fenômeno presente em muitas espécies de Bromeliaceae (Lenzi et al. 2006), produzindo frutos sem a necessidade da fecundação. Podendo levar a conclusões inexatas. Entende-se que *Dyckia leptostachya* se trata então, de uma espécie autoincompatível, pois a germinação das sementes resultantes de outros tratamentos, diferentes daqueles de polinização cruzada ou polinização natural, resultaram em uma taxa de germinação tão baixa que chega a ser quase irrelevante. Mesmo espécies autoincompatíveis, podem apresentar graus de variações autocompatíveis (Levin 1996; Proctor et al. 1996). Tanto fatores abióticos como fisiológicos da planta podem resultar na expressão do sistema de autoincompatibilidade. (Levin 1996; Stephenson et al. 2000).

De acordo com a razão pólen/óvulo, *D. leptostachya* é classificada como uma espécie xenogâmica, isso reafirma a ideia de um sistema de reprodução autoincompatível, uma vez que Cruden (1977) indaga que mesmo que uma espécie se autofertilize, as adaptações da flor favorecem a xenogamia, e a autofertilização pode ocorrer de maneira individual. Em vista disso, os resultados para *D. leptostachya* se tornam mais claros e evidentes, se tratando de uma espécie com sistema de reprodução autoincompatível, em nível populacional.

As diferenças entre as populações quanto ao número de flores e frutos de *D. leptostachya* sugerem maior sucesso reprodutivo na população do Parque Municipal Piraputangas, a qual está mais conservada; enquanto que a Fazenda São João apresenta indícios de redução do sucesso reprodutivo devido a fatores antrópicos. O maior número de indivíduos beneficia a população porque aumenta o sucesso da polinização ou fertilização, a reprodução e redução de cruzamentos entre plantas clones (Stephens et al. 1999).

Visitantes Florais

A morfologia das flores de *D. leptostachya*, com tubos relativamente curtos e não muito estreitos, é característica de espécies generalistas, porque tornam o néctar acessível a uma variada guilda de polinizadores (Faegri e Piji 1971). Bromélias de tubos curtos, como é o caso de *Dyckia leptostachya*, deveriam estar relacionadas, à polinização por abelhas ou mais de uma guilda de polinizadores (Siqueira-Filho e Machado 2006), além disso, a estrutura reprodutiva e a pigmentação floral (Benzing, 1980; Varadarajan e Brown 1988) deveriam indicar uma dependência quase total de beija-flores, sustentando a hipótese de que *D. leptostachya* seria uma espécie ornitofila. Alguns autores, como Kehler et al. (2005), afirmaram que a psicofilia, ou seja, polinização por borboletas e

mariposas, é pouco efetiva em Bromeliaceae, sugerindo que há uma variação quanto ao nível de efetividade das borboletas como polinizadora, sendo consideradas pilhadoras de néctar. Contudo, *Phoebis neocypris* de pequeno porte, frequentemente tocavam os órgãos reprodutivos das flores com as patas e realizavam visitas sistemáticas às flores em diferentes inflorescências, provavelmente atuando como polinizadores efetivos. De acordo com o princípio do polinizador mais efetivo proposto por Stebbins (1970), a seleção natural irá adaptar as características florais aos polinizadores que visitam as plantas repetidamente e mais efetivamente na região a qual a população evoluiu (Fenster et al. 2004), podendo afetar a evolução das características florais das populações de *Dyckia leptostachya*, através de seleção mediada por polinizadores. A relação das formigas com as flores de *D. leptostachya* se dá de forma mutualística positiva.

Dyckia leptostachya apresenta padrão subanual de floração, com disponibilidade “steady state”, ou seja, regular. A espécie foi classificada como psicófila, porém suas flores são visitadas frequentemente por beija-flores. A autoincompatibilidade no sistema de reprodução de *D. leptostachya* conclui que a germinação das sementes deve ser vista como um dos principais parâmetros de sucesso reprodutivo, e não apenas o “fruit set” que pode gerar erros, uma vez que, frutificação não implica em viabilidade de sementes, conforme foi amostrado neste estudo.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro. Diego Finati-Alves agradece pela bolsa de estudos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); Déborah Cainelli pela bolsa de

Iniciação Científica do CNPq; Maurício Lenzi pela bolsa de Desenvolvimento Científico Regional (FUNDECT/CNPq); e Gecele Matos Paggi pela bolsa produtividade nível 2 do CNPq.

Referências

- Aranda-Peres, A.N. & Rodriguez, A.P.M. 2006. Bromeliads. In: Silva, J. A. T. (Org). *Floriculture, ornamental and plant biotechnology*. Tokyo: Global Science Books, v.4, p.644-655.
- Araujo, A.C., Fischer, E.A. & Sazima M. 1994. Floração sequencial e polinização de três espécies de *Vriesea* (Bromeliaceae) na região de Juréia, sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, v.17. p.113-118.
- Barrett, S.C. 2002. The evolution of plant sexual diversity. *Nature Reviews Genetics*, v.3, p.274-284.
- Bencke, C.S.C. & Morellato, L.P.C. 2002. Comparação de dois métodos de avaliação da fenologia de plantas, sua interpretação e representação. *Revista Brasileira de Botânica* 25:269-275.
- Benzing, D.H. 2000. *Bromeliaceae: profile of an adaptive radiation*. Cambridge: Cambridge University Press, p.690.
- Bianchi, M.B., Gibbs, P.E., Prado, D.E. & Vesprini, J.L. 2000. Studies on the breeding systems of understory species of a Chaco woodland in NE Argentina. *Flora*, v.195, p.339-348.
- Bodanese-Zanettini, M.H. & Cavalli, S.S. 2003. Variabilidade genética em função do modo de reprodução. In: Freitas, L.B. & Bered, F. (eds) *Genética e Evolução Vegetal*. Porto Alegre: Editora UFRGS, v.1, p.177-188.
- Buzato, S., Sazima, M. & Sazima, I. 2000. Hummingbird-pollinated floras at three Atlantic Forest sites. *Biotropica*, v.32, p.824-841.

- Canela, M.B.F. & Sazima, M. 2003. *Aechmea pectinata*: a hummingbird-dependent bromeliad with inconspicuous flowers from the rainforest in South-eastern Brazil. Annals of Botany, v.92, p.731-737.
- Canela, M.B.F. & Sazima, M. 2005. The pollination of *Bromelia antiacantha* (Bromeliaceae) in the southeastern Brazil: ornithophilous *versus* melittophilous features. Plant Biology, v.7, p.411-416.
- Charlesworth, B. & Charlesworth, D. 2006. The evolutionary genetics of sexual systems in flowering plants, v.205, p.513-530.
- Cocucci, A. & Sérsic, A. 1998. Evidence of rodent pollination in subtropical South America. In: Owens, S.J. & Rudall, P.J. Reproductive biology. Royal Botanical Gardens, Kew, p.113-121.
- Crayn, D.M., Winter, K. & Smith, J.A.C. 2004. Multiple origins of crassulacean acid metabolism and the epiphytic habit in the Neotropical family Bromeliaceae. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.101, p.3703-3708.
- Cruden. R.W. 1977. Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. Evolution, v.3, p.1-46.
- Dafni, A. & Maués, M.M. 1998. A rapid and simple procedure to determine stigma receptivity. Sexual Plant Reproduction, v.11, p.177-180.
- Faegri, K. & Van Der Pijl, L. 1979. The principles of pollination ecology. Pergamon Press, Oxford.
- Fenster C.B; Armbruster W.S; Wilson P; Dudash M.R; Thomson J.D. Pollination Syndromes and Floral Specialization. Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics. Vol 35:375-403. 2004

- Filho, J.A.S. & Machado, I.C.S. 2001. Biologia Reprodutiva de *Canistrum aurantiacume*. Morren (Bromeliaceae) em Remanescente da Floresta Atlântica, Nordeste do Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, v.3, p.427- 443.
- Fonseca, L.C.N., Almeida, E.M. & Alves, M.A.S. 2008. Fenologia, morfologia floral e visitantes de *Psychotria brachypoda* (Müll. Arg.) Britton (Rubiaceae) em uma área de Floresta Atlântica, Sudeste do Brasil. *Acta Botânica Brasilica*, v.1, p.63-69.
- Forzza, R.C., Costa, A., Siqueira-Filho, J.A. & Martinelli, G. 2010. Bromeliaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
[\(<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB005772>\)](http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB005772). Acessado em 29 de maio de 2016.
- Frisch, J.D. & Frisch, C.D. 2005. Aves brasileiras e plantas que as atraem. Dalas Ecoltec, São Paulo, v.3, p. 480.
- Givnish, T.J., Barfuss, M.H.J., Ee, B.V., Riina, R., Schulte, K., Horres, R., Gonsiska, P.A., Jabaily, R.S., Crayn, D.M., Smith, J.A.C., Winter, K., Brown, G.K., Evans, T.M., Holst, B.K., Luther, H., Till, W., Zizka, G., Berry, P.E. & Sytsma, K.J. 2011 Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: insights from an eight-locus plastid phylogeny. *American Journal of Botany*, v.5, p.98-872.
- Gentry, HA. 1974. Flowering phenology and diversity in tropical Bignoniaceae. *Biotropica*, v.6, p.64-68.
- Goodwillie, C., Kalisz, S., and Eckert, C.G. 2005. The evolutionary enigma of mixed mating systems in plants: occurrence, theoretical explanations, and empirical evidence. *Annual Review of Ecology and Systematics*, v.36, p.47–79.
- Hmeljevski, K.V., Reis, A., Reis, M.S., Rogalski, M., Neto, C.D & Lenzi, M. 2007. Revista Brasileira de Biociências, v.5, p. 267-269.
- Jeff Ollerton, Ruben Alarcón, Nickolas M. Waser, Mary V. Price, Stella Watts, Louise Cranmer, Andrew Hingston, Craig I. Peter, John Rotenberry; A global test of the

pollination syndrome hypothesis, *Annals of Botany*, Volume 103, Issue 9, 1 June 2009, Pages 1471–1480

Kamke, R. 2009. Polinização por abelhas em *Aechmea caudata* Lindm., uma bromélia com características ornitófilas, na ilha de Santa Catarina, sul do Brasil. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina. 44 p.

Kearns, C.A. & Inouye, D.W. 1993. Techniques for pollination biologists. University Press, Niwot.

Kaehler, M., Varassin, I. G. & Goldenberg, R. 2005. Polinização em uma comunidade de bromélias em Floresta Atlântica Alto-montana no Estado do Paraná, Brasil. Revista Brasileira de Botânica, v.28, p.219-228.

Kessler, M. & Krömer, T. 2000. Patterns and ecological correlates of pollination modes among bromeliad communities of Andean forests in Bolivia. *Plant Biology*, v.2 p.659-669.

Kessler, M. 2002. Environmental patterns and ecological correlates of range size among bromeliad communities of Andean forest in Bolivian. *The Botanical Review*, v.68, p.100-127.

Krömer, T., Kessler, M., Lohaus, G. & Schmidt-Lebuhn, A. N. 2008. Nectar sugar composition and concentration in relation to pollination syndromes in Bromeliaceae. *Plant Biology*, v.10 p.502-511.

Lenzi M., Matos, J.Z. & Orth A.I. 2006. Variação morfológica e reprodutiva de *Aechmea lindenii* (E. Morren) Baker var. *lindenii* (Bromeliaceae). *Acta Botânica Brasílica*, v.20, n.2, p.487-500.

Levin, D.A. 1996. The evolutionary significance of pseudo self-fertility. *The American Naturalistic*, v.148, n.2, p.321-332.

- Lloyd, D.G. & Schoen, D.J. 1992. Self- and crossfertilization in plants. I. Functional dimensions. International Journal of Plant Sciences, v.153, p.358-369.
- Luther, H. E. 2012. *An alphabetical list of Bromeliad binomials*. The Bromeliad Society International, Sarasota, FL.
- Martinelli, G. 1994. Reproductive biology of Bromeliaceae in the Atlantic rainforest of Southeastern Brazil. PhD thesis. School of Biological and Medical Sciences, University of St. Andrews, Scotland.
- Martinelli, G. 1997. Biologia reprodutiva de Bromeliaceae na Reserva Ecológica de Macaé de Cima. In Serra de Macaé de Cima: Diversidade florística e conservação em Mata Atlântica (H.C. Lima, R.R. & Guedes-Bruni, eds.). IP/JBRJ, Rio de Janeiro, p.213-250.
- Marques, A.R. & Lemos Filho, J.P. 2008. Fenologia reprodutiva de espécies de bromélias na Serra da Piedade, MG, Brasil. Acta Botanica Brasilica 22:417-424.
- Newstrom, L.E., Frankie, G.W. & Baker, H.G. 1994. A new classification for plant phenology based on flowering patterns in Lowlands tropical rain forest trees at La Selva, Costa Rica. Biotropica, v.26, p.141-159.
- Nunes-Freitas, A.F. & Rocha, C.F.D. 2011. Reproductive phenology and flower visitor's guild of *Canistropsis microps* (Bromeliaceae) in an Atlantic Rainforest of southeastern Brazil. Journal of Natural History, 29 p.
- Paggi, G.M., Louzada, R.B., Ishii, I.H., Takahasi, A., Arruda, R.C.O. & Lorenz-Lemke, A.P. 2015. Rediscovering *Dyckia excelsa* (Bromeliaceae) in Mato Grosso do Sul, Brazil: taxonomy, geographic distribution and notes on leaf anatomy. Systematic Botany, v.1, p. 129-135.

- Piacentini, V.Q. & Varassin, I.G. 2007. Interaction network and the relationships between bromeliads and hummingbirds in an area of secondary Atlantic rain forest in southern Brazil. *Journal of Tropical Ecology*, v.23, p. 663-671.
- Porcher, E. & Lande, R. 2005. The evolution of self-fertilization and inbreeding depression under pollen discounting and pollen limitation. *Journal of Evolutionary Biology*, v.18, p.497-508.
- Porembski, S., Martinelli, G., Ohlemüller, R. & Barthlott, W. 1998. Diversity and ecology of saxicolous vegetation mats on inselbergs in the Brazilian Atlantic rainforest. *Diversity and Distributions*, v.4, p.107-119.
- Pott, A. & Pott, V.J. 1994. Plantas do Pantanal. EMBRAPA, Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal, Corumbá, MS, p.320.
- Pott, A., Silva, J.S.V., Salis, S.M., Pott, V.J. & Silva, M.P. 2000. Vegetação e uso da terra. In: JSV. Silva (Ed.). Zoneamento ambiental da Borda Oeste do Pantanal: Maciço do Urucum e Adjacências. Embrapa, Brasília, p.111-131.
- Proctor, M., Yeo, P. & Lack, A. 1996. The natural history of pollination. Oregon Timber Press, Oregon, USA, p.479.
- Ramírez, I.M. 2000. Pollinators in *Cryptanthus*: a hypothesis. *Journal of the bromeliad society*, v.51, p.65-70.
- Reitz, R. 1983. Bromeliáceas e a malária – bromélia endêmica. In: Reitz R. Flora Ilustrada Catarinense. Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí, Santa Catarina, p.559.
- Rogalski, J.M., Reis, A., Reis, M.S. & Hmeljevski, K.V. 2009. Biologia reprodutiva da reófita *Dyckia brevifolia* Baker (Bromeliaceae), no Rio Itajaí-Açu, Santa Catarina, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, v.4, p.691-702.
- Santos, T.C.C. & Câmara, J.B.D. 2002. GEO Brasil – perspectivas do meio ambiente no Brasil. Brasília: Edições IBAMA.

- Sakai, S., Momose, K., Yumoto, T., Nagamitsu, T., Nagamasu, H., Karim, A.A.H., Nakashizuka, T. & Inoue, T. 2005. Plant reproductive phenology and general flowering in a mixed dipterocarp Forest. In: Roubik, D.; Sakai, S. & Hamid, A. A.
- Soriano, B.M.A. 2000. Climatologia. In: J.S.V. Silva (org.). Zoneamento ambiental da borda oeste do Pantanal: maciço do Urucum e adjacências. Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, pp. 69-81.
- Siqueira-Filho, J.A. & Machado, I.C.S. 2001. Biologia reprodutiva de *Canistrum aurantiacum* E. Morren (Bromeliaceae) em remanescente da Floresta Atlântica, Nordeste do Brasil. Acta Botanica Brasiliensis, v.15, p.427-444.
- Stephens, P.A., Sutherland, W.J. & Freckleton, R.P. 1999. What is the Allee effect? Oikos, v.87, p.185-190.
- Stephenson, M. 2000. Development and validation of the Stephenson Multigroup Acculturation Scale (SMAS). Psychological Assessment, v.12, p.77-88.
- Sazima, I., Buzato, S. & Sazima, M. 1996. An assemblage of hummingbird – pollinated flowers in a montane forest in southeastern Brazil. Botanica Acta, v.109, p.149-160.
- Sazima, I., Vogel, S. & Sazima, M. 1989. Bat pollination of *Encholirium glaziovii*, a terrestrial bromeliad. Plants Systematics and Evolution, v.168, p.167- 179.
- Smith, L.B. & Downs, R.J. 1974. Pitcairnoideae (Bromeliaceae). Flora Neotropica. Monograph 14, part 1, p.1-658.
- Tagliati, M.C. 2012. Aspectos reprodutivos de uma comunidade de Bromeliaceae em um fragmento urbano de Floresta Atlântica do sudeste do Brasil. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Juiz de Fora. 72p.
- Takahasi, A. 2010. Ecologia da vegetação em bancadas lateríticas em Corumbá, MS. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.

- Takahasi, A. & Meirelles, S. T. 2014. Ecologia da vegetação herbácea de bancadas lateríticas (cangas) em Corumbá, MS, Brasil. *Hoehnea*, v.41, n.4, p.515-528.
- Taylor, C.M. & Hastings, A. 2005. Allee effects in biological invasions. *Ecology Letters*, 8, 895-908.
- Vesprini, J.L., Galetto, L. & Bernadello, G. 2003. The beneficial effect of ants on the reproductive success of *Dyckia floribunda* (Bromeliaceae), an extrafloral nectary plant. *Canadian Journal of Botany*, v.81, p.24-27.
- Vosqueritchian, S.B., & S. Buzato. 2006. Reprodução sexuada de *Dychia tuberosa* (Vell.) Beer (Bromeliaceae) Pitcairnioideae e interação planta-animal. *Revista Brasileira de Botânica*, v.3, p.433-442.
- Wendt, T., Canela, M.B.F., Klein, D.E. & Rios, R.I. 2002. Selfing facilitates reproductive isolation among three sympatric species of *Pitcairnia* (Bromeliaceae). *Plant Systematics and Evolution*, v.232, p.201-212.
- Williams-Linera, G. & Meave, J. 2002. Patrones fenológicos. In: Guariguata, M.R. & Katan, G.H. *Ecología y conservación de bosques neotropicales*. Ediciones LUR, San Jose, p. 408-431.
- Zangerl, A.R., J.K. Nitao, & M.R. Berenbaum. 1991. Parthenocarpic fruits in wild parsnip: decoy defence against a specialist herbivore. *Evolutionary Ecology*, v.5, p.136-145.
- Zeisler, M. 1938. Über die Abgrenzung der eigentlichen Naberfläche mit Hilfe von reaktionen. *Beihefte zum Botanischen Zentralblatt*, v.58, p.308-318.

Legendas de Figuras

Figura 1. *Dyckia leptostachya*: (A) Aspecto geral de um indivíduo adulto; (B) Indivíduo na Fazenda São João. (C) Detalhe do escapo floral com flores de coloração vermelhoalaranjadas; (D) Detalhe da flor em antese; (E) *Phoebis neocypris* polinizando flor; (F) Hymenoptera herbivorando flor; (G) Escapo floral com frutos ainda fechados. Fotos: G. M. Paggi (A e G); D. Finati-Alves (B, C, D, E e F).

Figura 2. Comparaçao da (A) Fenologia da espécie *Dyckia leptostachya*; (B) Pluviosidade média anual dos anos de 2016/17 na cidade de Corumbá, MS, Brasil; (C) Temperatura média anual dos anos de 2016/17 na cidade de Corumbá, MS, Brasil. Fonte: INMET. (*) pico de produção de néctar em *Dyckia leptostachya*; (**) escassez de produção de néctar em *Dyckia leptostachya*.

Figura 3. Néctar produzido por *Dyckia leptostachya* em seu período de antese floral.

Tabela 1. Receptividade do estigma de *Dyckia leptostachya* com peróxido de hidrogênio a 10%.

Períodos avaliados	Receptividade do estigma
Início da antese 7h	-
Seis horas após a antese 13	-
12 horas após a antese 19h	-
24 horas após a antese 7h	+++
36 horas após a antese 19h	++
48 horas após a antese 7h	+
60 horas após a antese 19h	-
72 horas após a antese 7h	-

(-) sem reação; (+) resposta positiva fraca; (++) resposta positiva forte; (+++) resposta positiva muito forte. (Adaptado de Dafni & Maués, 1998).

Tabela 2. Número de estruturas avaliadas (N), razão (R) e porcentagem (%), média (X) e desvio padrão (SD) das características reprodutivas de *D. leptostachya* (Bromeliaceae) no pantanal sul-matogrossense.

Características reprodutivas	N	R (%)	X ± SD
Flor por inflorescência	20	-	16 ± 5,4 (máx = 27, mín = 8)
Óvulo por flor	20	-	74 ± 6,5 (máx = 85, mín = 64)
Frutos produzidos por inflorescência	20	-	7 ± 3 (máx = 12, mín = 1)
Relação Fruto/Flor	-	7\16 (44%)	
Sementes por fruto	20	-	70 ± 7,6 (máx = 84, mín = 61)
Relação Semente/Óvulo	-	70\74 (95%)	

Tabela 3. Proporção fruto/flor, taxa de frutificação (em porcentagem) de frutos formados, número de sementes por fruto (média ± desvio padrão), número de sementes germinadas (num total de 150 sementes), e taxa de germinação (em porcentagem), por tratamento de polinização de *Dyckia leptostachya*, Corumbá, MS.

Tratamentos	Frutos/Flor (n= 20)	Taxa de frutificação	Sementes por fruto	Sementes Germinadas	Taxa de Germinação
AM	5	25	67 ± 2,2	3	2
AE	7	35	69 ± 1,8	5	3,33
PC	14	70	76 ± 1,7)	132	88
PL	19	95	82 ± 2,4	102	68
AG	3	15	52 ± 3,5	2	1,33

(AM) autopolinização manual; (AE) autopolinização espontânea; (PC) polinização cruzada; (PL) polinização livre (controle); (AG) Agamospermia.

Figura 1.

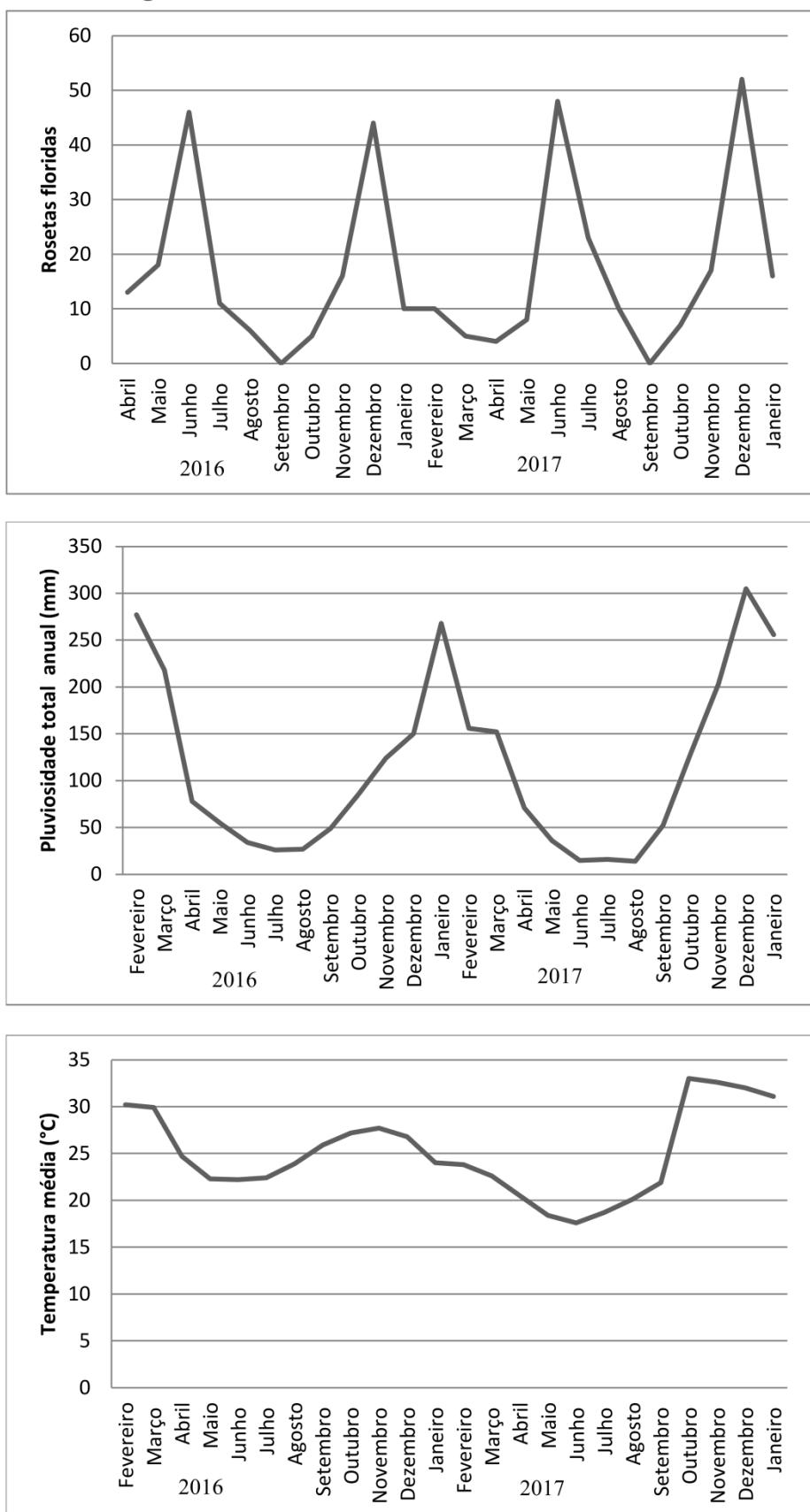


Figura 2.

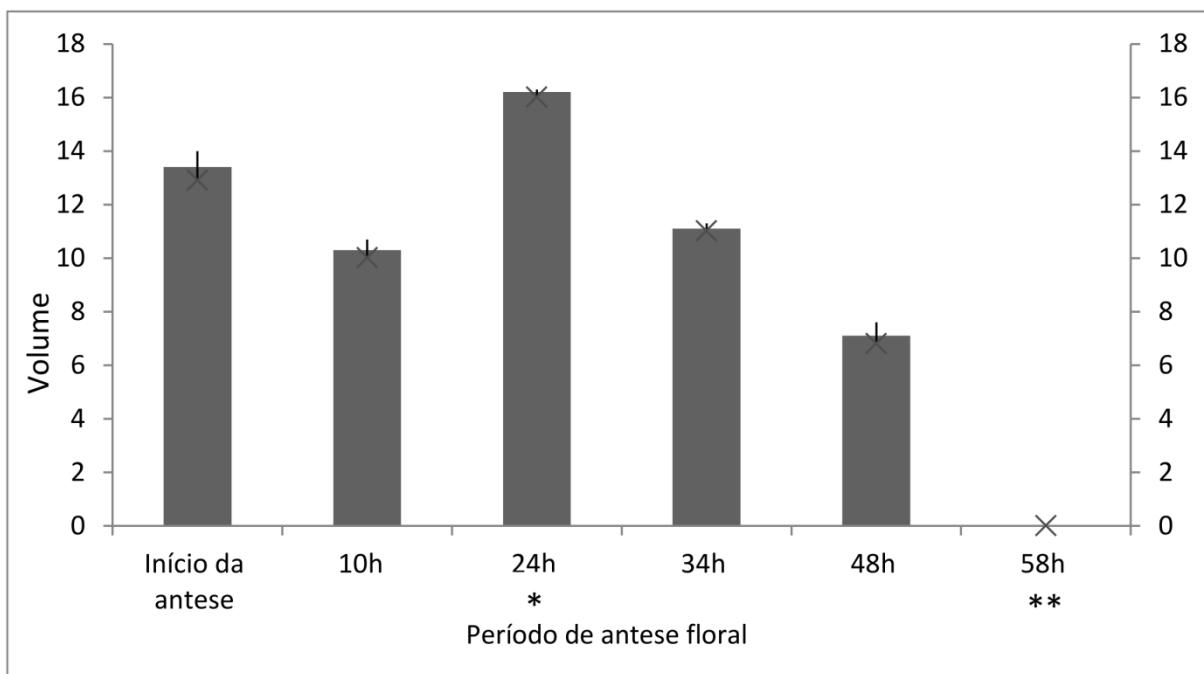


Figura 3.

