



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JOSÉ MARCELO PELLOSO MOLINA

**EVOLUÇÃO DE SISTEMAS SEXUAIS E BIOLOGIA
REPRODUTIVA DE ESPÉCIES ARBÓREAS NEOTROPICAIS
DA TRIBO DORSTENIEAE (MORACEAE)**

Londrina
2020

JOSÉ MARCELO PELLOSO MOLINA

**EVOLUÇÃO DE SISTEMAS SEXUAIS E BIOLOGIA
REPRODUTIVA DE ESPÉCIES ARBÓREAS NEOTROPICAIS
DA TRIBO DORSTENIEAE (MORACEAE)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biodiversidade e Conservação de Habitats Fragmentados).

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Lahoz da Silva Ribeiro

Londrina
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

M722 Molina, José Marcelo Peloso.
Evolução de sistemas sexuais e biologia reprodutiva de espécies arbóreas neotropicais da tribo Dorstenieae (Moraceae). / José Marcelo Peloso Molina. - Londrina, 2020.
65 f.

Orientador: José Eduardo Lahoz da Silva Ribeiro.
Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2020.
Inclui bibliografia.

1. Sistema reprodutivo - Tese. 2. Mapeamento estocástico - Tese. 3. Polinização - Tese. 4. Tripes - Tese. I. Ribeiro, José Eduardo Lahoz da Silva. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

CDU 574

JOSÉ MARCELO PELLOSO MOLINA

**EVOLUÇÃO DE SISTEMAS SEXUAIS E BIOLOGIA
REPRODUTIVA DE ESPÉCIES ARBÓREAS NEOTROPICAIS
DA TRIBO DORSTENIEAE (MORACEAE)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biodiversidade e Conservação de Habitats Fragmentados).

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Lahoz da Silva
Ribeiro
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dra. Aparecida Donizete de Faria
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dr. João Antonio Zequi
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dr. João Fernando Marques da Silva
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dr. José Luís Birindelli
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 27 de fevereiro de 2020.

MOLINA, José Marcelo Peloso. **Evolução de sistemas sexuais e biologia reprodutiva de espécies arbóreas neotropicais da tribo Dorstenieae (Moraceae)**. 2020 65 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

RESUMO

A família Moraceae compreende mais de 1500 espécies, distribuídas por toda região tropical e temperada. As inflorescências de Moraceae são extremamente complexas e diversificadas, além de expressarem ao menos quatro tipos diferentes de sistemas sexuais. A riqueza de espécies e a diversidade de sistemas sexuais, fazem de Moraceae um bom modelo para estudos da evolução dos sistemas sexuais em angiospermas. Em Moraceae, sistemas especializados de polinização são descritos em ao menos três tribos: Ficeae, Castilleae e Dorstenieae. Na região neotropical, Dorstenieae é representado predominantemente por espécies herbáceas do gênero *Dorstenia*, além de um clado arbóreo exclusivamente neotropical formado por três gêneros: *Brosimum*, *Helianthostylis* e *Trymatococcus*. Neste trabalho analisamos a evolução da sexualidade de espécies arbóreas neotropicais da tribo Dorstenieae. Descrevemos morfologicamente os sistemas sexuais das espécies de *Brosimum*, *Helianthostylis* e *Trymatococcus*, através da análise de amostras de herbários. Reconstruímos a filogenia do grupo a partir de dados moleculares dos segmentos *trnL-F*, *rbcL* e ETS, utilizando inferência bayesiana. Determinamos os estados ancestrais e as transições de sexualidade empregando mapeamento estocástico bayesiano de caracteres. E descrevemos e relacionamos a biologia reprodutiva de uma das espécies de *Brosimum* à aspectos morfológicos das inflorescências do grupo. Desta forma, dividimos o trabalho em dois capítulos: 1. Filogenia e evolução dos sistemas sexuais de espécies arbóreas neotropicais da tribo Dorstenieae (MORACEAE); 2. Biologia reprodutiva de *Brosimum gaudichaudii*, um novo registro de polinização por tripes (Thysanoptera) em Moraceae. Espécies do clado neotropical de Dorstenieae exibem quatro sistemas sexuais distintos: monoícia com mais de 50% das espécies, dioícia, androdioícia e trioícia. Nossos resultados revelaram que a partir de um ancestral monóico, sistemas dimórficos surgiram ao menos seis vezes dentro do clado. Além disso, a androdioícia e a trioícia em Dorstenieae não representam estados de transição para dioícia. Em *Brosimum gaudichaudii* Trécul, documentamos o terceiro caso confirmado de polinização por tripes (Thysanoptera) em Moraceae. *Haplothrips fiebrigi* Priesner, 1931 se reproduz nos ápices dos ramos e ovipositam sobre inflorescências em estágio inicial de desenvolvimento. Ninfas se desenvolvem sobre as inflorescências, e quando adultos transportam grãos de pólen ativamente entre inflorescências em fase estaminada e pistilada. A comparação entre inflorescências de diferentes espécies de *Brosimum* combinadas com a confirmação da polinização por tripes em *B. gaudichaudii* indicam que, assim como em *Castilla* (Castilleae), a polinização por tripes pode ser comum em espécies do gênero *Brosimum* (Dorstenieae).

Palavras-chave: Mapeamento estocástico. Monoícia. Polinização. Sistema reprodutivo. Tripes.

MOLINA, José Marcelo Pelloso. **Evolution of sexual systems and reproductive biology of neotropical tree species of the tribe Dorstenieae (Moraceae)**. 65 p. Thesis in Biological Sciences – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

ABSTRACT

The family Moraceae comprehends more than 1500 species, with distribution in all tropical and temperate regions. The inflorescences in Moraceae are very complexes and diversified, besides expressing at least four types of sexual systems. The species richness and diversity of sexual system make Moraceae a good model for studies focusing on evolution of sexual systems in angiosperms. In Moraceae, specialized pollination systems are described for at least three tribes: Ficeae, Castilleae and Dorstenieae. In the neotropical region, Dorstenieae is represented predominately by herbaceous taxa of genus *Dorstenia*, in addition to an exclusively neotropical arboreal clade formed by three genera: *Brosimum*, *Helianthostylis* and *Trymatococcus*. In this present study we analysed the evolution of sexuality in Neotropical tree species of tribe Dorstenieae. Sexual systems were morphologically described for species of genera *Brosimum*, *Helianthostylis* and *Trymatococcus* using herbarium samples. Phylogeny was estimated from combined molecular data of plastid *trnL-F*, *rbcL* and nuclear ETS segments using bayesian inference. Ancestral state character and transitions of sexuality characters were inferred using bayesian stochastic mapping. Finally, reproductive biology were described for a *Brosimum* species and related to morphological aspects of inflorescences of the group. Thus, this study was divided in two chapters: 1. Phylogeny and evolution of sexual systems of neotropical tree species of tribe Dorstenieae (Moraceae), 2. Reproductive biology of *Brosimum gaudichaudii* Trécul, a new record of thrips pollination (Thysanoptera) in Moraceae. Species of neotropical clade of Dorstenieae exhibit four distinct sexual systems: monoecious in more than 50% of species, dioecious, androdioecious and trioecious. Our results showed dimorphic systems arose at six times along the clade. Furthermore, androdioecy and trioecy in Dorstenieae do not represent transition states to dioecy. In *Brosimum gaudichaudii*, we confirmed the third record of thrips pollination (Thysanoptera) in Moraceae. *Haplothrips fiebrigi* Priesner, 1931 reproduces at branch tips and oviposits on inflorescences at early state of development. Nymphs complete its development on these inflorescences, and when adults, actively transport pollen among staminate- and pistillate-phase inflorescences. Comparison of inflorescences of different *Brosimum* species allied with the confirmation of thrips pollination in *B. gaudichaudii* indicates that, as in *Castilla* (Castilleae), thrips pollination may be frequent in *Brosimum* species.

Key words: Stochastic mapping. Monoecia. Pollination. Reproductive system. Stumbles

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	7
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15
1 CAPÍTULO 1	18
1.1 INTRODUÇÃO.....	20
1.2 MATERIAL E MÉTODOS	22
1.2.1 Caracterização Morfológica dos Sistemas Sexuais.....	22
1.2.2 Amostragem Taxonômica	22
1.2.3 Extração de DNA, Amplificação e Sequenciamento.	23
1.2.4 Alinhamento e Modelo de Substituição	24
1.2.6 Evolução de Caracteres Reprodutivos	25
1.3 RESULTADOS.....	25
1.3.1 Caracterização dos Sistemas Sexuais.....	25
1.3.2 Relações Filogenéticas	26
1.3.3 Evolução dos Sistemas Sexuais	28
1.4 DISCUSSÃO.....	30
1.4.1 Caracterização dos Sistemas Sexuais.....	30
1.4.2 Relações Filogenéticas	31
1.4.3 Evolução dos Sistemas Sexuais	32
1.5 CONCLUSÕES	34
1.6 LITERATURA CITADA	35
2 CAPÍTULO 2	39
2.1 INTRODUÇÃO.....	41
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	43
2.2.1 Área de Estudo	43
2.2.2 Fenologia e Biologia Floral.....	43
2.2.3 Observação e Coleta de Visitantes Florais.....	44
2.2.4 Experimentos de Polinização e Sucesso Reprodutivo	45
2.3 RESULTADOS.....	46
2.3.1 fenologia e Biologia Floral.....	46

2.3.2	Observação e Coleta de Visitantes Florais.....	48
2.3.3	Experimentos de Polinização e Sucesso Reprodutivo	50
2.4	DISCUSSÃO.....	50
2.5	CONCLUSÕES	53
26	LITERATURA CITADA	54
	APÊNDICE I.....	58
	APÊNDICE II - sistemas sexuais de brosimum, helianthostylis e trymatococcus ..	59
	APÊNDICE III.....	60
	APÊNDICE IV- filogenia combinada dos segmentos trnl-f, ets de espécies arbóreas neotropicais da tribo dorstenieae (moraceae). as probabilidades posteriores bayesianas são indicadas em cada clado.....	65
	APÊNDICE V	65

INTRODUÇÃO GERAL

A família Moraceae é subdividida em seis tribos: Moreae, Artocarpeae, Maclureae, Dorstenieae, Castilleae e Ficeae; e compreende 53 gêneros com aproximadamente 1500 espécies, sendo 750 do gênero *Ficus*.

Moraceae é amplamente dispersa em regiões tropicais a temperadas, mas o grupo está melhor representado em florestas tropicais pluviais de baixa altitude na Região Neotropical (Ribeiro, 2007; Judd *et al.* 2009), onde representa 27% das espécies e 50% de todos os gêneros encontrados na região.

A família apresenta espécies com inflorescências extremamente diversas e complexas, podendo ser bissexuadas ou unissexuadas, racemosas, cimosas ou capitadas. As flores são sempre unissexuadas, mas se arranjam em inflorescências expressando diferentes sistemas sexuais.

A ampla diversidade de espécies e a riqueza de sistemas sexuais faz de Moraceae um excelente modelo de estudo sobre evolução de sistemas sexuais em angiospermas (Datwyler e Weiblen, 2004; Clement e Weiblen, 2009). A grande maioria das espécies são monoicas, mas também podem ser dioicas, ginodioicas ou androdioicas (Datwyler e Weiblen, 2004).

Androdioicia e ginodioicia são tradicionalmente definidos por indivíduos com flores bissexuais, hermafroditas, coexistindo com outros que apresentam apenas flores estaminadas (androdioicia) ou apenas flores pistiladas (ginodioicia) (Sakai e Weller, 1999; Cardoso *et al.* 2018). Entretanto o arranjo floral das espécies ginodioicias e androdioicias em Moraceae difere das demais espécies de Angiospermas. Nas espécies de Moraceae as flores são sempre unissexuadas, portanto os indivíduos bissexuais apresentam flores estaminadas e pistiladas em uma mesma inflorescência ou inflorescências unissexuadas, estaminadas e pistiladas localizadas em diferentes partes da planta.

A dioicia é considerada o estado ancestral de Moraceae (Weiblen *et al.* 2000; Datwyler e Weiblen, 2004; Clemente e Weiblen, 2009), sendo que a monoicia e a ginodioicia evoluíram a partir da dioicia em pelo menos cinco momentos na família (Zhang *et al.* 2018).

A androdioicia, sistema extremamente raro em angiospermas (Renner e Ricklefs, 1995), aparece nas tribos Dorstenieae e Castilleae, porém, pouco se sabe sobre a origem da androdioicia em Moraceae.

Zhang *et al.* (2018) não encontraram suporte para a origem da androdioicia em Castilleae, e sugerem que em Dorstenieae a androdioicia possivelmente surgiu a partir da

monoícia, contudo, a baixa amostragem dos táxons gerou uma imagem fragmentada da evolução dos sistemas sexuais em Moraceae. Uma alternativa para melhorar as inferências dos processos evolutivos é priorizar estudos de linhagens que mostram alta diversidade de sistemas sexuais e com uma melhor amostragem de táxons (Weeks *et al.* 2009).

Outro fator de extrema relevância para compreensão da diversificação de sistemas sexuais em angiospermas, é o conhecimento sobre a biologia reprodutiva do grupo, relacionando a morfologia floral com aspectos funcionais da sexualidade das espécies (Sakay e Weller, 1999).

Em *Ficus*, um dos mais estudados casos de adaptação de sistemas de reprodução, interação entre planta e inseto direcionou a diversificação de ambos a longo prazo (Cruaud *et al.* 2012). As flores de *Ficus* são polinizadas por pequenas vespas (Hymenoptera: Agaonidae) que entram nos sicônios e ovipositam nas flores carpeladas. As larvas crescem se alimentando do tecido de flores especializadas, e quando se tornam adultos, copulam e deixam o sicônio carregando grãos de pólen em busca de uma nova inflorescência para iniciar um novo ciclo (Ramirez, 1974; Bronstein e McKey, 1989; Weiblen, 2002; Jusselin *et al.* 2003).

A atenção especial ao caso de *Ficus*, fez com que os sistemas de polinização dos demais grupos de Moraceae fossem negligenciados e mesmo após descobertas de novos sistemas de polinização extremamente especializados em outros tribos (El-Sawa, 1998; Sakai *et al.* 2000), muitas espécies de Moraceae, incluindo espécies de Dorstenieae, permaneceram consideradas como polinizadas pelo vento (Datwyler e Weiblen, 2004).

Hoje se sabe que em espécies de *Artocarpus* (Artocarpeae), micélios fungicos infectam o tecido da inflorescência estaminada e servem de alimento para pequenos mosquitos galhadores (Cecidomyiinae: Diptera). Esses por sua vez, ovipositam na inflorescência e suas larvas também se nutrem do micélio até se tornarem pupa. Quando adultos, os mosquitos carregam grãos de pólen até as inflorescências pistiladas, atraídos aparentemente pela fragância floral (El-Sawa, 1998; Momose *et al.* 1998; Sakai *et al.* 2000; Gardner *et al.* 2018).

Em *Antiaropsis decipiens* K.Schum. e *Castilla elastica* Cerv. (Castilleae), pequenos insetos da ordem Thysanoptera ovipositam sobre inflorescências estaminadas antes da antese, e quando adultos, se alimentam e carregam pólen entre inflorescências estaminadas e pistiladas (Sakai, 2001; Zerega *et al.* 2004).

Em *Dorstenia arifolia* (Dorstenieae), moscas da família Lauxaniidae polinizam ao ovopositar nas inflorescências, onde larvas se alimentam do ovário de flores pistiladas ou do tecido do receptáculo (Araújo, 2008).

Essas evidências reforçam a hipótese de que em Moraceae, a diversidade de

formas e a condensação progressiva das inflorescências foi direcionada por insetos predadores de tecidos florais que evoluíram para sistemas de polinização, nos quais a inflorescência é local de reprodução e desenvolvimento do polinizador (Berg, 1989; Rohwer, 1993), e que esse mecanismo pode se estender a diversas outras espécies filogeneticamente próximas a *Ficus*.

A tribo Dorsteneiae (Moraceae), abrange 13 gêneros e 147 espécies, com ao menos três sistemas sexuais descritos. *Dorstenia*, o maior gênero, com mais de 100 espécies são predominantemente monóicas, distribuídas na região tropical das Américas e da África (Ribeiro, 2007; The Plant List, 2013), *Dorstenia* são sempre herbáceas, enquanto as demais espécies de Dorsteneiae são principalmente arbóreas (Rohwer, 1993).

No neotrópico, Dorsteneiae é representada por 47 espécies de *Dorstenia*, além de outras 19 espécies de outros gêneros que formam um grupo exclusivamente neotropical e arbóreo. Esse grupo é subdividido em três gêneros: *Brosimum*, o maior, com 15 espécies, destas, quatro espécies possuem um total de nove subespécies, os dois outros pequenos gêneros, *Helianthostylis* e *Trymatococcus*, possuem apenas duas espécies cada (Tab. 1) (Ribeiro, 2007; The Plant List, 2013; Zhang *et al.* 2019).

Tabela 1 - Espécies arbóreas neotropicais da tribo Dorsteneiae (The Plant List, 2013), e classificação infragenérica de *Brosimum* proposta por Berg (1972).

Gênero	Subgênero	Seção	Espécie/subespécie
<i>Brosimum</i> Sw.	<i>Brosimum</i>	<i>Brosimum</i>	<i>Brosimum alicastrum</i> subsp. <i>alicastrum</i> Sw. <i>Brosimum alicastrum</i> subsp. <i>bolivarense</i> (Pittier) C.C.Berg <i>Brosimum acutifolium</i> subsp. <i>acutifolium</i> Huber <i>Brosimum acutifolium</i> subsp. <i>obovatum</i> (Ducke)C.C.Berg
		<i>Brosimopsis</i> (S. Moore) CC Berg	<i>Brosimum lactescens</i> (S.Moore) C.C.Berg <i>Brosimum costaricanum</i> Liebm.
		<i>Piratinera</i> (Aubl.) CC Berg	<i>Brosimum guianense</i> (Aubl.) Huber ex Ducke <i>Brosimum gaudichaudii</i> Trécul <i>Brosimum glaziovii</i> Taub. <i>Brosimum glaucum</i> Taub.
	<i>Ferolia</i> (Aubl.) CC Berg		<i>Brosimum rubescens</i> Taub. <i>Brosimum melanopotamicum</i> C.C.Berg <i>Brosimum utile</i> subsp. <i>utile</i> (Kunth) Oken <i>Brosimum utile</i> subsp. <i>allenii</i> (Woodson) C.C.Berg <i>Brosimum utile</i> subsp. <i>ovatifolium</i> (Ducke) CCBerg <i>Brosimum longifolium</i> Ducke <i>Brosimum multinervium</i> C.C.Berg

			<i>Brosimum potabile</i> Ducke <i>Brosimum parinarioides</i> subsp. <i>parinarioides</i> Ducke <i>Brosimum parinarioides</i> subsp. <i>amplicomma</i> (Ducke) C.C.Berg
<i>Trymatococcus</i> Poepp. & Endl.			<i>Trymatococcus amazonicus</i> Poepp. & Endl. <i>Trymatococcus oligandrus</i> (Benoist) Lanj.
<i>Helianthostylis</i> Baill.			<i>Helianthostylis sprucei</i> Baill. <i>Helianthostylis steyermarkii</i> C.C.Berg

Espécies do gênero *Brosimum* são árvores de pequeno a grande porte (mais de 40m de altura), monoicas ou dioicas, com inflorescências bissexuadas nas monóicas ou unissexuadas nas dióicas, globosas ou discóides, recobertas por brácteas peltadas, entre as quais surgem flores estaminadas numerosas e/ou flores pistiladas de uma a várias (Berg, 1972) (Fig. 1 A-H; Fig. 2 A-F).

O gênero *Brosimum* se distribui desde o México, Antilhas, Cuba e Jamaica, até o sul do Brasil. A maioria das espécies ocorre em áreas de terra firme da Floresta Tropical Amazônica, e três delas (*B. guianenses*, *B. rubescens*, *B. lactescens*) se estendem até a Mata Atlântica. *Brosimum glaucum* e *B. glaziovii* são endêmicas da Mata Atlântica, já *B. gaudichaudii* é a única espécie que ocorre no Cerrado e também ocupa vegetações secas em todas as regiões do Brasil. (Berg, 2001, Ribeiro e Pederneiras, 2020).

Berg (1972) subdivide *Brosimum* em dois subgêneros, *Brosimum* subgen. *Brosimum* e *Brosimum* subgen. *Ferolia*. O subgênero *Brosimum* é ainda dividido em três seções: *Brosimum*, *Brosimopsis* e *Piratinera*. As seções *Brosimum* e *Brosimopsis* representam espécies dioicas, com distribuição predominantemente na região norte da América do Sul e América Central, já a seção *Piratinera* representa espécies predominantemente monoicas com distribuição de Norte a Sul da América do Sul.

O gênero *Helianthostylis* consiste em árvores de pequeno porte, androdioicas, com inflorescências bissexuais ou estaminadas, globosas ou turbinadas, com uma única flor pistilada imersa no centro do receptáculo. As flores estaminadas apresentam pistilódio bem desenvolvido e são pouco numerosas nas inflorescências bissexuadas, já nas inflorescências estaminadas aparecem em grande número (Berg, 1972). (Fig. 2 G)

As duas espécies reconhecidas de *Helianthostylis* são endêmicas da Floresta Amazônica, *Helianthostylis sprucei* ocorre em florestas de terra firme ao longo de toda a Bacia Amazônica Brasileira e também na Colômbia, Equador e Peru. *Helianthostylis steyermarkii* ocorre na parte norte da Alta Bacia Amazônica (noroeste do Amazonas) e Venezuela. (Berg, 2001, Ribeiro e Pederneiras, 2020).

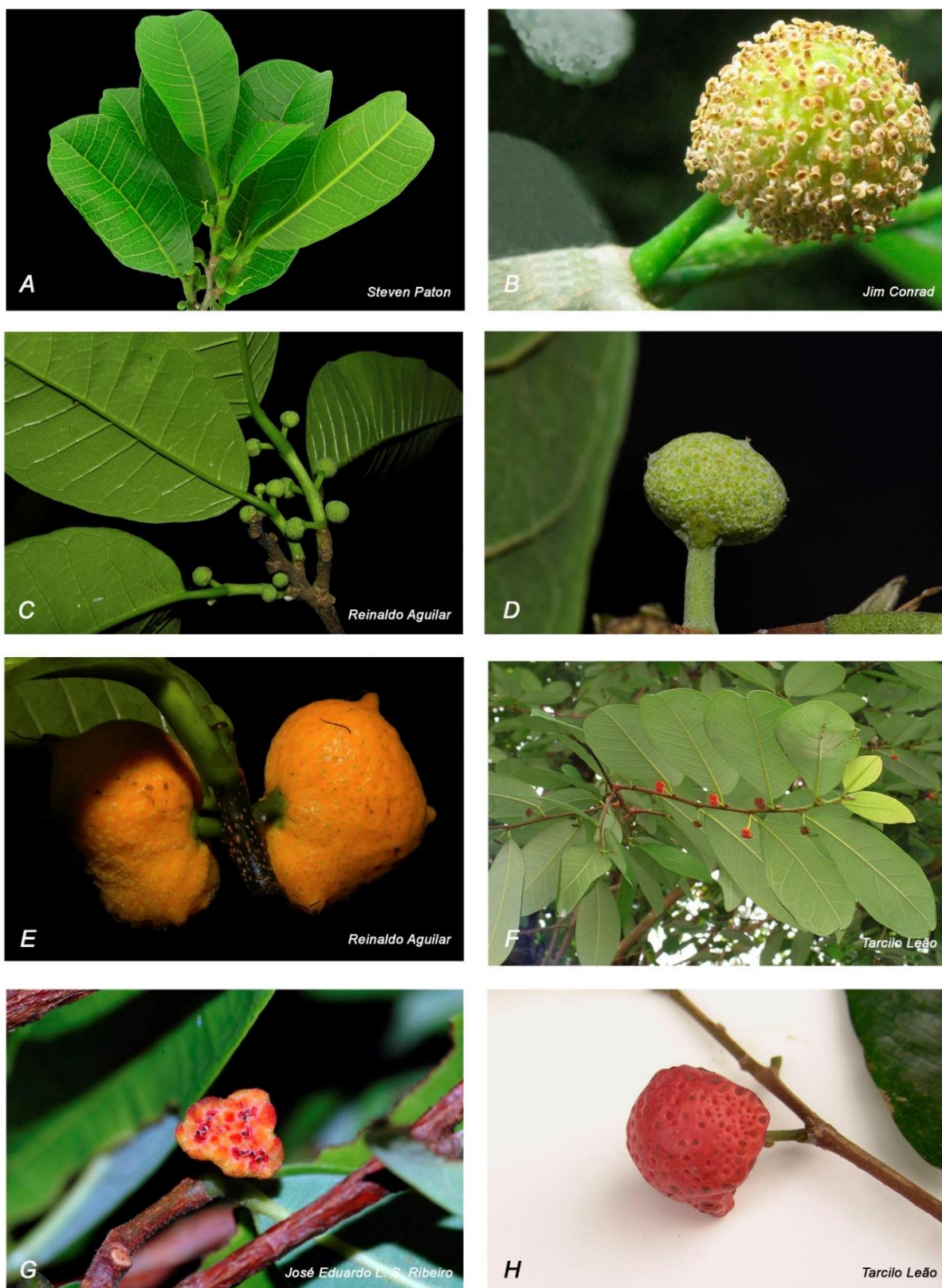


Figura 1 -*Brosimum alicastrum*, hábito e inflorescências pistiladas (A), inflorescência estaminada (B); *B. lactescens*, hábito (C), inflorescência pistilada (D); fruto (E); *B. guianense*, hábito (F), inflorescência (G), fruto (H).

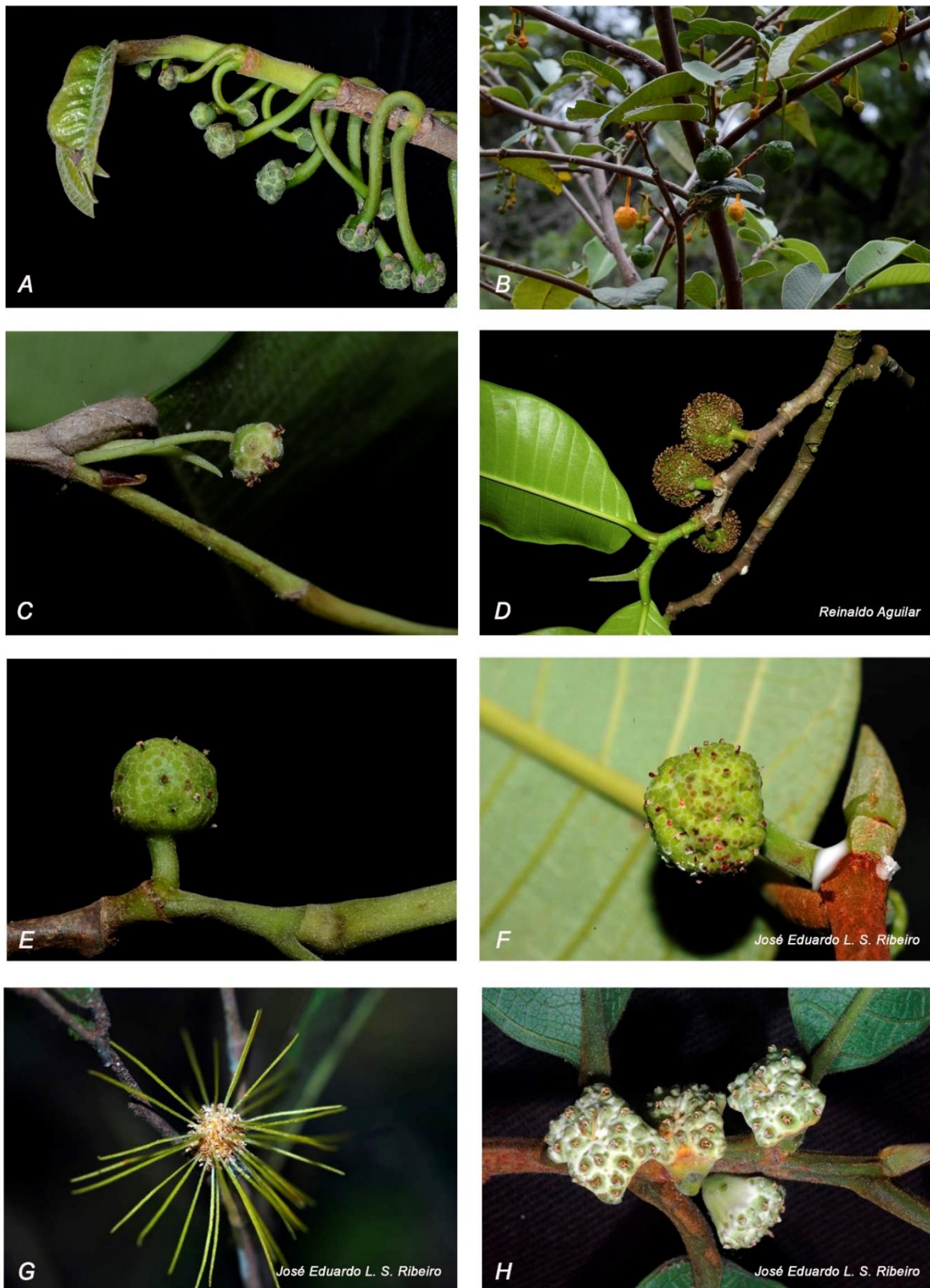


Figura 2 - *Brossimum gaudichaudii*, inflorescências bissexuais (A), fruto (B); *B. rubescens*; inflorescência estaminada (C); *B. utile*, inflorescência bissexual (D); *B. potabile*, inflorescência bissexual (E); *B. parinarioides* subsp. *parinarioides*, inflorescência bissexual (F); *Helianthostylis sprucei*; inflorescência estaminada (G); *Trymatococcus amazonicus*; inflorescência bissexual (H).

Trymatococcus compreende espécies monoicas, com inflorescências turbinadas, bissexuais, e flores estaminadas concentradas na parte superior do receptáculo, onde uma única flor pistilada é localizada no centro, imersa no receptáculo (Berg, 2001) (Fig. 2 H).

Trymatococcus amazonicus ocorre em toda a Bacia Amazônica, nos países Brasil, Colômbia, Venezuela, Guiana, Suriname e Guiana Francesa, enquanto *T. oligandrus* é restrito ao estado do Amapá, além da Guiana e Guiana Francesa (Berg, 2001, Ribeiro e Pederneiras, 2020).

Datwyler e Weiblen (2004), Zerega *et al.* (2005) e Zhang *et al.* (2018, 2019) acharam suporte para o monofiletismo do clado neotropical arbóreo de Dorstenieae, porém pouco se sabe sobre as relações entre os gêneros e entre as espécies do gênero *Brosimum*. Estudos anteriores sugerem que o gênero *Brosimum* é parafilético (Silva, 2007; Zhang *et al.* 2019), entretanto uma melhor amostragem dos táxons é necessária para compreendermos melhor esses relacionamentos.

A baixa amostragem das filogenias conhecidas, somado à ocorrência de ao menos três tipos de sistemas sexuais, além do total desconhecimento dos sistemas de reprodução e polinização, faz do grupo arbóreo neotropical de Dorstenieae extremamente relevante para a compreensão da evolução dos sistemas reprodutivos em Moraceae e nas demais angiospermas.

Nesse contexto, o presente estudo tem o objetivo de descrever a evolução dos sistemas sexuais das espécies arbóreas neotropicais da tribo Dorstenieae: caracterizando morfologicamente os sistemas sexuais das espécies dos gêneros *Brosimum*, *Helianthostylis* e *Trymatococcus*; reconstruindo estados ancestrais e transições de sexualidade; além de descrever e relacionar a biologia floral ao sistema de polinização apresentado em uma das espécies.

Desta forma, os capítulos a seguir tem como objetivos específicos:

CAPÍTULO 1 – “Evolução dos sistemas sexuais de espécies arbóreas neotropicais da tribo Dorstenieae (MORACEAE).”

- Determinar morfologicamente os sistemas sexuais das espécies de *Brosimum*, *Helianthostylis* e *Trymatococcus*.
- Reconstruir filogeneticamente as relações entre espécies do gênero *Brosimum*, *Helianthostylis* e *Trymatococcus*.
- Determinar os estados ancestrais e as transições de sexualidade no grupo.

CAPÍTULO 2 – “Biologia reprodutiva de *Brosimum gaudichaudii* Tréc., um novo registro de polinização por Tripes (Thysanoptera) em Moraceae.”

- Descrever a fenologia de floração de *B. gaudichaudii* no estado de São Paulo.
- Analisar a dinâmica de abertura das flores e a biologia das inflorescências e flores.
- Documentar os sistemas de reprodução e de polinização de *B. gaudichaudii*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Araújo LM. 2008. *Biologia reprodutiva de espécies raras e ameaçadas de extinção de Dorstenia L. (Moraceae)*. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa, Brasil.
- Berg CC. 1972. *Olmedieae and Brosimeae. Flora Neotropica*. Hafner Publishing Company: New York.
- Berg, CC. 1989. Classification and distribution of Ficus. *Experientia* 45(7): 605-611.
- Berg, CC. 1990. Differentiation of flowers and inflorescences of Urticales in relation to their protection against breeding insects and to pollination. *Sommerfeltia* 11: 13–24.
- Berg, CC. 2001. *Morae, Artocarpaceae and Dorstenia (Moraceae): with introductions to the family and Ficus and with additions and corrections*. Flora Neotropica. New York Botanical Garden, New York.
- Bronstein JL, McKey D. 1989. The fig/pollinator mutualism: A model system for comparative biology. *Ecology and Evolutionary Biology* 45: 601-604.
- Clement WL, Weiblen GD. 2009. Morphological evolution in the mulberry family (Moraceae). *Systematic Botany* 34: 530–552.
- Croat, TB. 1978. *Flora do Barro Colorado Island*. Stanford University Press, California, USA.
- Cruaud, A, Rønsted, N, Chantarasuwan, B, Chou, LS, Clement, WL, Couloux, A, Savolainen, V. 2012. An Extreme Case of Plant–Insect Codiversification: Figs and Fig-Pollinating Wasps. *Systematic Biology* 61(6): 1029–1047.
- Datwyler SL, Weiblen GD. 2004. On the origin of the fig: phylogenetic relationships of Moraceae from *ndhF* sequences. *American Journal of Botany* 91: 767–777.
- El-Sawa S. 1998. *Pollination and breeding of jackfruit (Artocarpus heterophyllus Lam.) in south Florida*. Tese de doutorado. Florida International University, Miami.
- Gardner EM, Gagné RJ, Kendra PE, Montgomery WS, Raguso RA, McNeil TT, Zerega NJC. 2018. A Flower in Fruit's Clothing: Pollination of Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*, Moraceae) by a New Species of Gall Midge, *Clinodiplosis ultracrepidata* sp. nov. (Diptera: Cecidomyiidae). *International Journal of Plant Sciences* 179(5): 350-367.
- Jousselin E, Rasplus JY, Kjellberg F. 2003. Convergence and coevolution in a mutualism: evidence from a molecular phylogeny of *Ficus*. *Evolution* 57(6): 1255-1269.
- Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF, Donoghue MJ. 2009. *Sistemática Vegetal: Um Enfoque Filogenético*. 3ª Edição. Porto Alegre: Artmed.
- Momose, K, Yumoto, T, Nagamitsu, T, Kato, M, Nagamasu, H, Sakai, S, Inoue, T. 1998. Pollination biology in a lowland dipterocarp forest in Sarawak, Malaysia. I. Characteristics of

- the plant-pollinator community in a lowland dipterocarp forest . *American Journal of Botany* 85(10): 1477–1501.
- Ramirez WB. 1974. Co-evolution of Ficus and Agaonidae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 61: 770–780.
- Renner SS, Ricklefs RE. 1995. Dioecy and its correlates in the flowering plants. *American Journal of Botany* 82: 596-606.
- Ribeiro JELS. 2007. *Estudos sobre filogenia, taxonomia e evolução de caracteres reprodutivos em Moraceae Gaudich.* Tese de doutorado. Universidade de Campinas, Brasil.
- Ribeiro, JELS, Pederneiras, LC. *Brosimum* in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB10107>>. Acesso em: 20 Fev. 2020
- Rohwer JG, 1993. Moraceae. In: Kubitzki K, Rohwer JG, Bittrich V, Eds. *The Families and Genera of Vascular Plants*. Springer- Verlag: Berlin, 438–453.
- Sakai AK, Weller SG. 1999. Gender and sexual Dimorphism in Flowering Plants: A review of terminology, Biogeographic Patterns, Ecological Correlates, and Phylogenetic Approaches. In: Geber MA, Dawson TE, Delph LF, orgs. *Gender and Sexual Dimorphism in Flowering Plants*. Springer-Verlag: Heidelberg, 1-31.
- Sakai SM, Kato H, Nagamasu H. 2000. *Artocarpus* (Moraceae)-gall midge pollination mutualism mediated by a male-flower parasitic fungus. *American Journal of Botany* 87: 440–445.
- Sakai S. 2001. Thrips pollination of androdioecious *Castilla elastica* (Moraceae) in a seasonal tropical forest. *American Journal of Botany* 88: 1527–1534.
- Silva WS. 2007. Sistemática filogenética dos gêneros neotropicais da tribo Dorstenieae Dumort. *Brosimum* Sw, *Helianthostylis* Baillon e *Trymatococcus* Poepp. & Endl. (MORACEAE). Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Amazonas, Brasil.
- The Plant List 2013. Version 1.1. Published on the Internet; <http://www.theplantlist.org/> (accessed 1st January).
- Weeks SC, Chapman EG, Rogers DC, Senyo DM, Hoeh WR. 2009. Evolutionary transitions among dioecy, androdioecy and hermaphroditism in limnadiid clam shrimp (Branchiopoda: Spinicaudata). *Journal of Evolutionary Biology* 22: 1781–1799.
- Weiblen GD, Oyama RK, Donoghue MJ. 2000. Phylogenetic analysis of dioecy in monocotyledons. *The American Naturalist* 155: 46-58.
- Weiblen GD, Bush GL. 2002. Speciation in fig pollinators and parasites. *Molecular Ecology* 11: 1573–1578.
- Zerega NJC, Mound LA, Weiblen GD. 2004. Pollination in the new guinea endemic *Antiaropsis decipiens* (Moraceae) is mediated by a new species of thrips, *Thrips antiaropsidis* sp. nov.

(Thysanoptera: Thripidae). *International Journal of Plant Sciences* 165(6): 1017–1026.

Zerega NJC, Clement WL, Datwyler SL, & Weiblen GD. 2005. Biogeography and divergence times in the mulberry family (Moraceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 37(2): 402–416.

Zhang Q, Onstein RE, Little SA, Sauquet H. 2018. Estimating divergence times and ancestral breeding systems in *Ficus* and Moraceae. *Annals of Botany* 23(1): 191-204.

Zhang Q, Zerega N, Sauquet H. 2019. Long-distance dispersal shaped the diversity of tribe Dorstenieae (Moraceae) – *bioRxiv*, in press. doi: 10.1101/531855.

1 CAPÍTULO 1

Evolução de sistemas sexuais de espécies arbóreas neotropicais da tribo Dorstenieae (Moraceae).

Artigo a ser submetido ao periódico “Annals of Botany” –
https://academic.oup.com/aob/pages/General_Instructions

RESUMO

A família Moraceae consiste em mais de 1500 espécies e por possuir pelo menos quatro tipos diferentes de sistemas sexuais, é considerada um excelente modelo de estudo sobre evolução da sexualidade em Angiospermas. O clado neotropical de árvores em Dorstenieae compreende 19 espécies com ao menos três sistemas sexuais descritos. O objetivo desse estudo foi descrever a evolução dos sistemas sexuais na clado arbóreo neotropical da tribo Dorstenieae. Determinamos morfologicamente os sistemas sexuais dos gêneros *Brosimum*, *Helianthostylis* e *Trymatococcus*. Reconstruímos a filogenia, os estados ancestrais e as transições dos sistemas sexuais no grupo. A determinação de sexualidade foi confirmada por meio de amostras de herbário. As análises filogenéticas foram conduzidas usando inferência bayesiana a partir de dados dos segmentos *trnL-F*, *rbcL* e ETS. A árvore produzida foi utilizada para reconstrução dos estados ancestrais por mapeamentos estocástico bayesiano. Nossos resultados demonstram que o gênero *Brosimum* é parafilético com a exclusão dos gêneros *Helianthostylis* e *Trymatococcus*. As espécies do clado neotropical de Dorstenieae exibem quatro sistemas sexuais distintos: monoícia com mais de 50% das espécies, dioícia, androdioícia e trioícia. Ao menos seis transições de monoícia para sistemas dimórficos foram observadas. Todos os sistemas dimórficos (dioícia, androdioícia e trioícia) verificados em Dorstenieae originaram de ancestrais monoicos. Portanto, a androdioícia e a trioícia não representam sistemas transitórios para dioícia em Dorstenieae.

Palavras-chave: androdioícia; dioícia; monoícia; mapeamento estocástico; reconstrução do estado ancestral; sistema reprodutivo.

1.1 INTRODUÇÃO

A tribo Dorstenieae (Moraceae) compreende 147 espécies e 13 gêneros. O gênero *Dorstenia* é o maior, com mais de 100 espécies, todas elas herbáceas e distribuídas na região tropical das Américas e africana (Rohwer, 1993; Ribeiro, 2007).

No neotrópico Dorstenieae é representada por 47 espécies de *Dorstenia*, além de outros três gêneros, que formam um clado natural de espécies arbóreas e exclusivamente neotropical (Zhang *et al.* 2019). O gênero *Brosimum* é o maior com 15 espécies, destas, quatro espécies possuem um total de nove subespécies, enquanto *Helianthostylis* e *Trymatococcus* são pequenos gêneros, com apenas duas espécies cada (Rohwer, 1993).

O monofiletismo do grupo arbóreo neotropical de Dorstenieae, formado pelos gêneros *Brosimum*, *Helianthostylis* e *Trymatococcus*, é sustentado por diversos autores (Datwyler e Weiblen, 2004; Zerega *et al.* 2005; Zhang *et al.* 2018, 2019), porém, pouco se sabe sobre as relações entre os gêneros e entre as espécies do gênero *Brosimum*.

Estudos anteriores sugerem que *Brosimum* é parafilético (Silva, 2007; Zhang *et al.* 2019), sendo necessária uma maior e melhor amostragem dos táxons para desvendar essas relações.

Espécies do gênero *Brosimum*, *Helianthostylis* e *Trymatococcus* podem ser monoicas, dioicas ou androdioicas, com pequenas inflorescências globosas ou turbinadas, com poucas ou numerosas flores estaminadas, e geralmente com uma ou poucas flores pistiladas, rodeada de flores estaminadas nas espécies monoicas (Fig. 3)

Berg (1972) subdivide *Brosimum* em dois subgêneros, *Brosimum* subgen. *Brosimum* e *Brosimum* subgen. *Ferolia*. O subgênero *Brosimum* é ainda dividido em três seções, *Brosimum*, *Brosimopsis* e *Piratinera*. As seções *Brosimum* e *Brosimopsis* representam espécies dioicas, com distribuição predominantemente na região Norte da América do Sul e América Central, já a seção *Piratinera* representa espécies predominantemente monoicas com distribuição de Norte a Sul da América do Sul.

Apesar de ampla diversidade de sistemas sexuais no grupo, muitas espécies do gênero *Brosimum* ainda apresentam descrições dos sistemas sexuais duvidosa ou indefinida. Além disso, sistemas raros como a androdioicia e a ginodioicia, podem ser mais comuns do que se tem conhecimento em Moraceae (Datwyler e Weiblen, 2004).

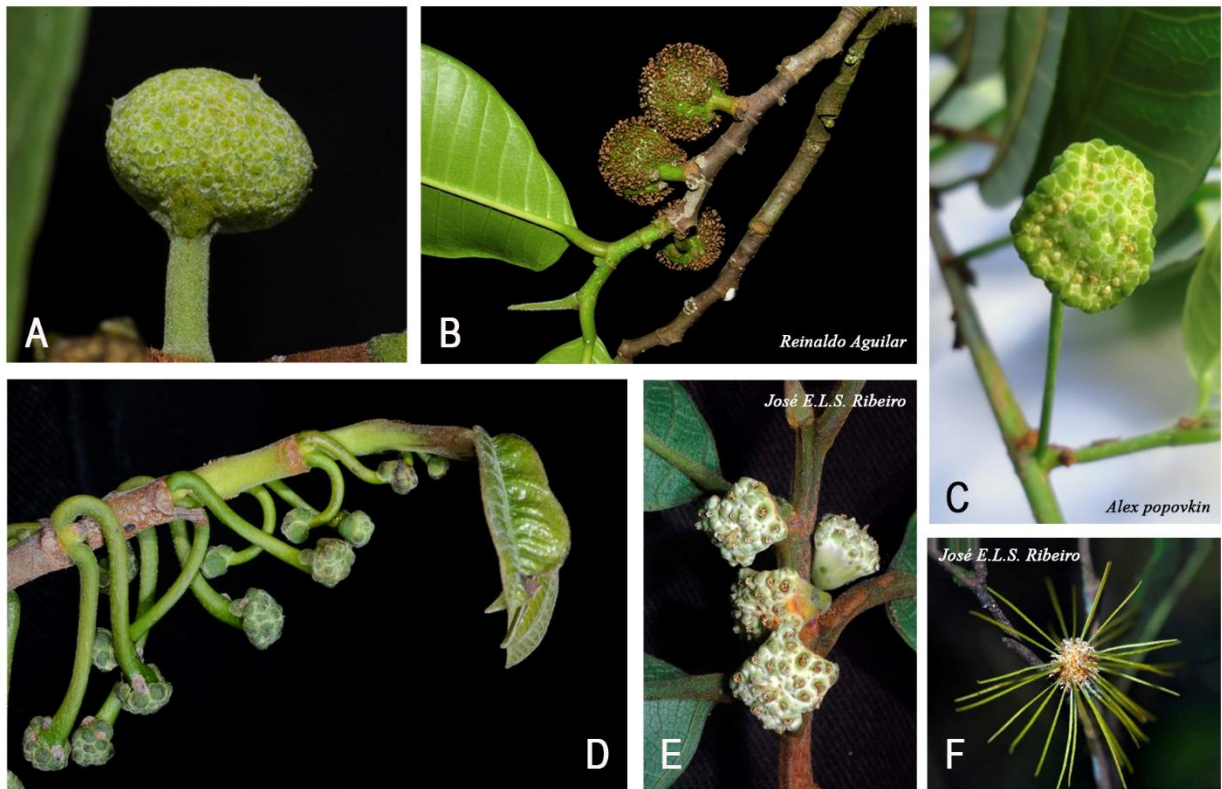


Figura 3 - Inflorescência pistilada de *Brosimum lactescens* (A), inflorescências bissexuadas em *B. utile* (B), *B. guianenses* (C), *B. gaudichaudii* (D) e inflorescência estaminada de *Helianthostylis sprucei* (F).

Muitas teorias sobre a evolução da sexualidade das flores foram desenvolvidas nos últimos séculos (Charlesworth e Charlesworth, 1978; Bawa, 1980; Charlesworth 1999; Webb 1999; Barret 2002). Essas teorias se baseiam na hipótese de que as angiospermas tenderiam a se tornar dioicas, e sistemas sexuais como a androdioicia e a ginodioicia seriam estágios de transição da monoicia à dioicia (Darwin, 1877), e esse por sua vez, seria um caráter irreversível nas plantas (Bull e Charnov, 1985).

Em Moraceae, essa tendência não é observada (Zhang *et al.* 2018). A dioicia é considerada o estado ancestral (Weiblen, 2000; Datwyler e Weiblen, 2004; Clemente e Weiblen, 2009), já a monoicia e a ginodioicia teriam evoluído a partir de ancestrais dioicos em pelo menos cinco momentos na família (Zhang *et al.* 2018), incluindo em Dorstenieae.

O ancestral do grupo formado por *Brosimum*, *Helianthostylis* e *Trymatococcus* é monoico (Zhang *et al.* 2018), portanto, a dioicia, observada em algumas espécies de *Brosimum*, são reversões ao estado ancestral da família.

A androdioicia, sistema sexual extremamente raro em angiospermas (Renner e Ricklefs, 1995), aparece nas tribos Dorstenieae e Castilleae.

Em *Castilla* (Castilleae), Sakay (2001) sugere que androdioicia teria evoluído

a partir da dioícia, já que espécies intimamente relacionadas eram androdioicas e outras espécies do gênero dioicas. Já em *Helianthostylis* (Dorstenieae) a androdioícia parece ter surgido a partir da monoícia (Zhang *et al.* 2018), porém, a baixa amostragem dos táxons relacionados à espécies androdioicas, torna esses resultados bastante insustentáveis.

Uma alternativa é melhorar a amostragem dos táxons, além de priorizar linhagens que mostram alta diversidade de sistemas sexuais (Weeks *et al.* 2009), como a tribo Dorstenieae.

Nesse contexto, o presente estudo tem o objetivo de descrever a evolução dos sistemas sexuais das espécies arbóreas neotropicais da tribo Dorstenieae: caracterizando morfologicamente os sistemas sexuais das espécies dos gêneros *Brosimum*, *Helianthostylis* e *Trymatococcus*; reconstruindo a filogenia, os estados ancestrais e transições de sexualidade do grupo.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

1.2.1 Caracterização Morfológica dos Sistemas Sexuais

A caracterização morfológica dos sistemas sexuais do grupo foi realizada a partir de observações de exemplares in situ e de materiais depositados nos herbários INPA, PDBFF e FUEL (APÊNDICE III). As inflorescências foram hidratadas e observadas em microscópio estereoscópico quanto à presença das seguintes estruturas: flores estaminadas, número de estames, grãos de pólen nas anteras, flores pistiladas, número de flores pistiladas, presença de ovário e óvulo. Os dados obtidos foram comparados com as descrições morfológicas e as informações sobre o sistema reprodutivo descritos por Berg (1972, 2001) Ribeiro (2007) e Silva (2007).

1.2.2 Amostragem Taxonômica

A amostragem de material para sequenciamento de DNA foi efetuada entre 2016 e 2019, através da coleta de espécies dos gêneros: *Dorstenia* (2), *Brosimum* (11), *Helianthostylis* (2) e *Trymatococcus* (2).

Foram amostrados 15 espécies e 4 subespécies, que corresponde a aproximadamente 79% das espécies do clado neotropical arbóreo, 73% de todas as espécies de

Brosimum e 100% dos gêneros *Helianthostylis* e *Trymatococcus*.

Amostras de 11 espécies foram coletas em campo nos fragmentos do Projeto Dinâmica Biológica de Fragmentos Florestais (PDBFF) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia (INPA) no Estado do Amazonas. *Brosimum gaudichaudii* foi coletado na Floresta Estadual de Assis, estado de São Paulo, *B. glaziovii* e *B. alicastrum* foram coletadas e enviadas por pesquisadores colaboradores do Rio de Janeiro e México respectivamente. Amostra de *Helianthostylis steyermarkii* foi obtida de material de herbário cedido pelo INPA.

As amostras de folhas foram fragmentadas e desidratadas em sílica-gel, onde foram mantidas até o início das análises. Sequências de DNA de *Trymatococcus oligandrus* foram adquiridas no Genbank. *Dorstenia hirta* Desv. e *Dorstenia tenuis* Bonpl. ex Bureau, utilizadas como grupo externo, foram extraídas de plantas cultivadas em casa-de-vegetação na Universidade Estadual de Londrina (UEL). A relação completa do material utilizado na análise filogenética está disponível no (APÊNDICE I).

1.2.3 Extração de DNA, Amplificação e Sequenciamento.

As extrações, amplificações e sequenciamentos das amostras foram realizadas no Laboratório de Genética e Ecologia Animal (LAGEA) da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

O DNA total foi extraído de 20 a 50 mg de folhas secas, utilizando o kit de extração DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Crawley, UK).

Foram amplificados duas regiões do *trnL-F* (*primers* “c”-“d” e “e”-“f”), a região codificadora *rbcL* do cloroplasto e mais a região nuclear ETS (*primers* 18S e Hel1). A amplificação do DNA para as três regiões foram realizadas com volume final de 15 µL (1x GoTaq® Green Master Mix (Promega), 1,33µM de cada *primer*, 2µL de amostra DNA e água).

A PCR para amplificação das regiões foram adaptadas de White *et al.* 1990, seguindo as seguintes condições: temperatura inicial de desnaturação de 94°C por dois minutos, seguida de 35 ciclos, cada ciclo com desnaturação a 94°C durante 40s - 1 min, pareamente a 52°C/57°C/62°C por 40s – 1 min e 30s e extensão 72°C por 1 min – 2 min, com extensão final a 72°C por mais seis minutos (Tab. 2).

Os produtos amplificados foram purificados (Illustra ExoProStar GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) e submetidos ao sequenciamento com reação de BigDye™ Terminator v3.1 de acordo com as recomendações do fabricante no sequenciador automático

ABI-ORISM 3500-XL (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Tabela 2 - Condições de amplificação dos segmentos *trnL-F*, *rbcL* e ETS.

Segmentos		<i>trnL-F</i> “e” “f”	<i>trnL-F</i> “c” “d”	ETS / <i>rbcL</i>
Desnaturação		2 min.	2 min.	2 min.
Desnaturação	35 ciclos	1 min.	1 min.	40 seg.
Pareamento		1:30 min.	50 seg.	40 seg.
Extensão		2 min.	1 min.	1 min.
Extensão final		6 min.	6 min.	6 min.

1.2.4 Alinhamento e Modelo de Substituição

As sequências foram montadas, verificadas e alinhadas usando ClustalX no programa Mesquite 3.6. Os alinhamentos finais foram visualmente verificados e pequenos ajustes foram definidos manualmente.

Para verificar a incongruência entre os segmentos utilizados foi realizado o teste ILD de Farris *et al.* (1994).

Modelos de substituição de nucleotídeos foram selecionados sob o critério de informação Akaike para cada conjunto de dados da região separadamente usando o programa jModeltest v.2.1.3. Os melhores modelos de substituição foram: TPM1uF+I para a região *trnL-F*, HKY para a região *rbcL* e TPM2uF+G para o segmento nuclear ETS.

1.2.5 Análise Filogenética

As análises filogenéticas foram conduzidas usando inferência Bayesiana, no BEAST v.2 por meio do CIPRES Science Gateway (<http://www.phylo.org/>; Miller *et al.* 2010). As análises de inferência Bayesiana foram implementadas usando o relógio molecular anterior ajustado para taxa 1, a árvore anterior foi ajustada para o modelo de especiação de árvore de Yule. Foram realizadas três análises independentes de 100 milhões de gerações cada, amostrando a cada 10.000 gerações.

Depois de confirmar se as três corridas convergiram, as combinamos usando o Log combiner v2.6.1, aplicando a cada 10000 gerações e descartando as primeiras 10%. As estatísticas das árvores foram resumidas na árvore MCC (Maximum Clade Credibility) no TreeAnnotator v 2.6.0. Os resultados foram examinados no Tracer v.1.4.1 (Rambaut *et al.* 2013) para garantir a convergência e um tamanho de amostra eficaz e suficiente.

1.2.6 EVOLUÇÃO DE CARACTERES REPRODUTIVOS

Na reconstrução dos caracteres ancestrais adotamos a árvore MCC produzida a partir da análise do BEAST. Para determinar o melhor modelo para o conjunto de dados utilizamos o critério de informação de Akaike (Akaike, 1974).

Os estados ancestrais foram estimados a partir de 1000 repetições do mapeamento estocástico bayesiano de caracteres (Bollback, 2006) sob o modelo assimétrico ("ARD") usando a função `make.simmap` do pacote `phytools` (Revell, 2012) no R Development Core Team (2009). A matriz de transição Q foi fixada nos valores padrões, a análise calculou estados ancestrais em cada nó como probabilidades posteriores marginais para todos os estados de caráter.

1.3 RESULTADOS

1.3.1 Caracterização dos Sistemas Sexuais

A análise morfológica das inflorescências do grupo arbóreo neotropical de *Dorstenieae*, evidenciou a existência de quatro tipos de sistemas sexuais: dioícia, monoícia, androdioícia e trioícia (APÊNDICE II), sendo o último registrado pela primeira vez em *Moraceae*.

Brosimum alicastrum, *Brosimum acutifolium*, *Brosimum lactescens*, *Brosimum costaricanum* são espécies dioicas, com inflorescências estaminadas com múltiplas flores e inflorescência pistilada na maioria das vezes com uma única flor em *Brosimum alicastrum* e *Brosimum acutifolium*, e comumente três flores pistiladas em *Brosimum lactescens*.

Espécies monoicas são a grande maioria no clado neotropical de *Dorstenieae*: *Brosimum gaudichaudii*, *Brosimum glaucum*, *Brosimum glaziovii*, *Brosimum guianense*, *Brosimum longifolium*, *Brosimum melanopotamicum*, *Brosimum multinervium*, *Brosimum potabile*, *Brosimum utile*, *Trymatococcus amazonicus* e *Trymatococcus oligandrus* apresentam suas inflorescências, na maioria das vezes, com uma única flor pistilada central circundada por múltiplas flores estaminadas.

A análise dos materiais de herbário, juntamente com observações em campo, possibilitou concluir que todas as espécies monoicas de *Brosimum* são protogínicas, ou seja, as

flores pistiladas entram em antese antes das flores estaminadas. Portanto, indivíduos em estágio inicial de floração podem apresentar apenas flores pistiladas e, em contrapartida, estágios finais de floração terão um predomínio de flores estaminadas e flores pistiladas em senescência, muitas vezes deterioradas externamente.

Em *Helianthostylis*, as espécies são androdioicas, com inflorescências globosas, com poucas flores estaminadas na inflorescência bissexual e muitas na inflorescência estaminada. O sistema reprodutivo de *B. rubescens* foi definido como androdioico, tendo em vista que apresenta duas formas sexuais de inflorescências: a primeira e mais comum é bissexual, com muitas flores estaminadas e número variado de flores pistiladas, e a segunda é uma pequena inflorescência estaminada com um pequeno número de flores (3 a 10 flores), presentes em indivíduos diferentes da população.

1.3.2 Relações Filogenéticas

Ao final da amplificação, não foi possível obter segmentos de algumas espécies. *B. acutifolium* subsp. *acutifolium* não amplificou nenhum segmento. Em *B. gaudichaudii* não foi possível obter segmentos “c-d” da região *trnL-F*. Também não foi possível amplificar o segmento ETS das espécies *B. acutifolium* subsp. *obovatum* e *H. sprucei* e os segmentos *rbcL* das espécies *Dorstenia hirta*, *B. acutifolium* subsp. *obovatum*, *B. alicastrum*, *B. parinarioides* subsp. *amplicoma*, *B. potabile* e *H. sprucei*.

A análise de incongruência revelou que os segmentos do cloroplasto são incongruentes, enquanto o segmento nuclear não demonstrou incongruência com os demais. Quando analisados separadamente apenas os segmentos congruentes (APÊNDICE IV e V), a topologia da árvore resultante se alterou quando comparada à árvore gerada com os três segmentos concatenados, no entanto a sustentação dos ramos foi maior quando utilizado os três segmentos.

A análise combinada dos três segmentos foi suficiente para resolver as relações entre as espécies dos gêneros *Brosimum*, *Helianthostylis* e *Trymatococcus*. Todos os ramos apresentaram boa sustentação (probabilidade posterior > 0,95), exceto as relações de *B. lactescens* e *B. acutifolium* subsp. *obovatum* que apresentaram valores inferiores.

Brosimum, *Helianthostylis* e *Trymatococcus* formam um agrupamento monofilético (Fig. 4, clado A), assim como os gêneros *Helianthostylis* e *Trymatococcus* (Fig. 4, clado D). Entretanto, o gênero *Brosimum* se confirma não monofilético, uma vez que os gêneros *Helianthostylis* e *Trymatococcus* também estão agrupados juntos.

O subgênero *Brosimum* (Berg, 1972) forma um grupo monofilético (Fig. 4, clado C), apesar da baixa sustentação entre *B. lactescens* e as demais espécies do clado.

A seção Piratinera, pertencente ao subgênero *Brosimum*, forma um grupo monofilético com boa sustentação (Fig. 4, clado E), enquanto as seções *Brosimum* e *Brosimopsis* são parafiléticas, agrupadas juntamente com o subgênero *Piratinera*.

O subgênero *Ferolia* (Berg, 1972) não forma um grupo natural devido ao posicionamento de *B. parinarioides* subsp. *parinaiorides* (Fig. 4, clado B) que aparece com grupo irmão de todas as espécies do clado neotropical, entretanto, os restantes das espécies do subgênero são monofiléticas.

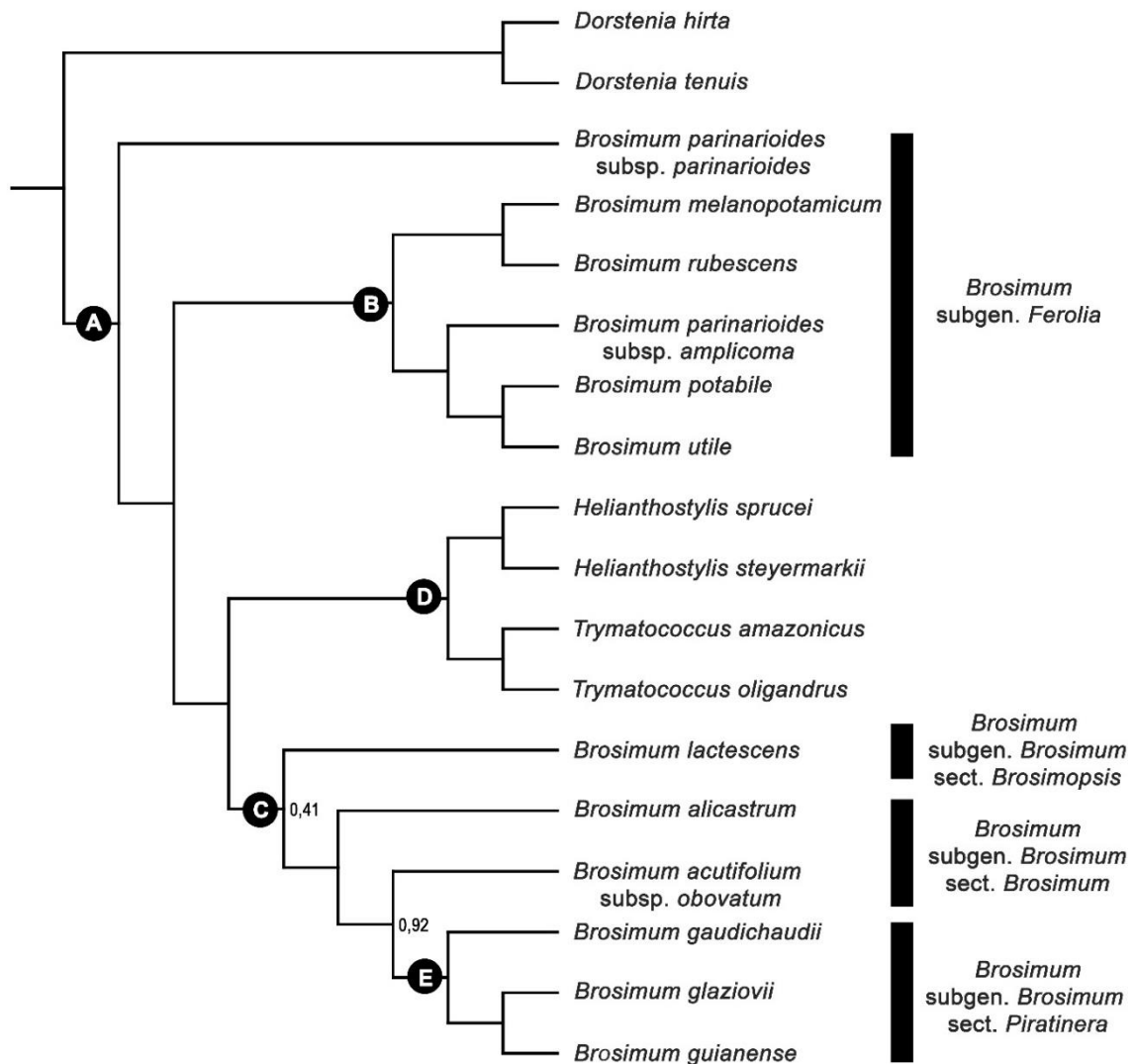


Figura 4 - Filogenia combinada dos segmentos *trnL-F*, *rbcL* e ETS de espécies arbóreas neotropicais da tribo Dorstenieae (Moraceae). As probabilidades posteriores bayesianas (Beast) são mostradas apenas nos ramos não suportados (< 0,95). Barra de escala indica as subdivisões do gênero *Brosimum* proposto por Berg (1972).

As subespécies de *B. parinarioides* não formam um clado, *B. parinarioides* subsp. *amplicomma* aparece como grupo irmão de *B. potabile* e *B. utile*, enquanto *B. parinarioides* subsp. *parinarioides* revela-se como irmã de todo o clado arbóreo neotropical.

1.3.3 Evolução dos Sistemas Sexuais

O mapeamento estocástico de caracteres bayesianos do sistema sexual ancestral de Dorstenieae neotropical se revelou incerto, com proporções aproximadamente iguais para todos os estados analisados (Fig. 5). O ancestral direto do clado arbóreo neotropical de Dorstenieae também se mostrou incerto, com uma maior probabilidade para a monoícia. A incerteza dos estados ancestrais dos ramos inferiores torna variado os cenários possíveis de evolução.

A monoícia se confirma como estado ancestral do clado formado por *Brosimum*, *Helianthostylis* e *Trymatococcus*, excluindo a subespécie *B. parinarioides* subsp. *parinarioides*. Nesse clado podemos observar a predominância da monoícia como estados ancestrais.

A evolução para androdioícia ocorre em dois momentos, em *B. rubescens* e no ancestral direto de *Helianthostylis*. *Brosimum rubescens* descende de ancestral monoico, enquanto *Helianthostylis sprucei* e *H. steymarkii* descendem de um ancestral também androdioico.

Três reversões independentes para dioícia são observadas, em *B. lactescens*, *B. alicastrum* e *B. acutifolium* subsp. *obovatum*.

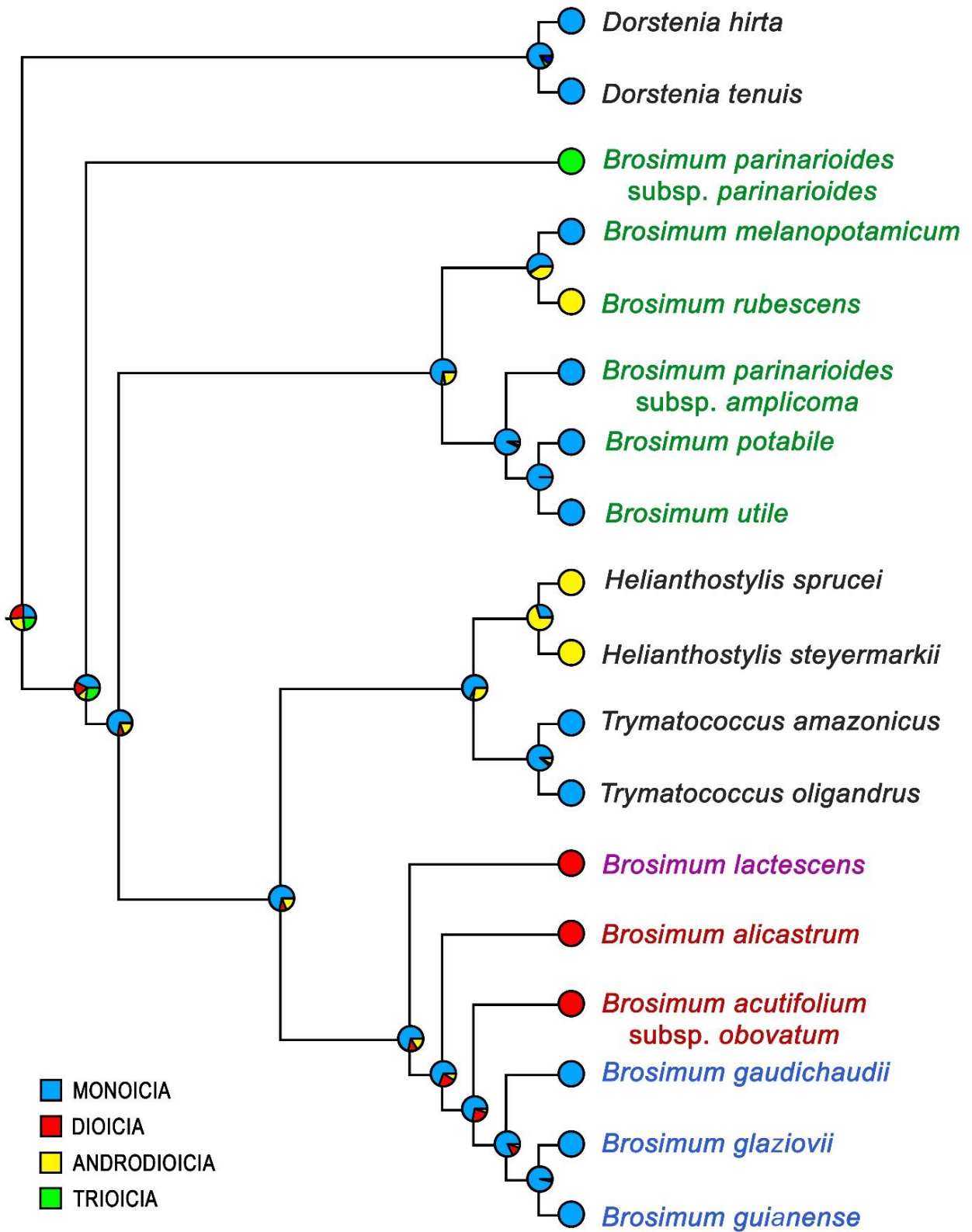


Figura 5 - Mapeamento estocástico bayesiano dos sistemas sexuais em *Brosimum*, *Helianthostylis* e *Trymatococcus*. Os gráficos de pizza nos nós representam estados ancestrais onde foram calculados a probabilidade posterior marginal. Cores dos táxons indicam os agrupamentos proposto por Berg (1972): subgênero *Ferolia* e subgênero *Brosimum* seções *Brosimopsis*, *Brosimum* e *Piratinera*.

1.4 DISCUSSÃO

1.4.1 Caracterização dos Sistemas Sexuais

O subgênero *Brosimum* seções *Brosimum* e *Brosimopsis* propostas por Berg (1972), envolve apenas espécies dioicas, com inflorescências estaminadas com múltiplas flores. Em algumas espécies dioicas, a flor pistilada projeta parte do estilete para a parte externa da inflorescência. Berg (2001) relata que em *Brosimum alicastrum*, espécie pertencente ao subgênero *Ferolia*, núvens de pólen são formadas à partir de inflorescências estaminadas, sugerindo de polinização pelo vento (Berg, 2001).

Nas demais espécies *Brosimum* apenas a extremidade do estigma fica evidente durante a antese, permanecendo o estilete totalmente imerso no receptáculo, assim como as flores estaminadas, que ficam discretamente expostas entre as escamas na inflorescência. Essas síndromes indicam que espécies monoicas de *Brosimum* possuem adaptações para polinização por insetos (Croat, 1978; Berg, 1990), dessa maneira a morfologia da inflorescência permitiria que larvas de insetos acessem as flores estaminadas, e ao mesmo tempo, impediria que as mesmas danifiquem a flor pistilada (Berg, 2001).

A sexualidade de *Brosimum glaziovii* era até então descrita como possivelmente unissexual (Berg, 1972). Nossos resultados demonstraram que todas as inflorescências de *B. glaziovii* são sempre bissexuais, com uma única flor pistilada, com ovário e estilete imerso no receptáculo, e apenas uma pequena porção do estigma pouco evidente entre as escamas peltadas.

Brosimum utile já foi descrito como “usualmente monoica” ou “monoica raro dioica” (Berg, 1972; Ribeiro, 2007), porém todas as inflorescências analisadas eram bissexuadas, portanto a espécie é certamente monóica.

Brosimum melanopotamicum e *B. multinervium* foram tratadas como dioicas por Berg (1972), Ribeiro (2007) e Silva (2007). Contudo, a análise mais minuciosa das inflorescências, mostrou que as espécies são monoicas, essas espécies também expõem discretamente o pistilo entre escamas peltadas.

O fato de todas as espécies de *Brosimum* serem protogínicas e a exposição do estigma ser sutil em algumas espécies, pode ser motivos dos equívocos e dúvidas quando à sexualidade morfológica das espécies registradas por Berg (1972) e Ribeiro (2007).

Berg (1972) classifica *B. parinarioides* subsp. *parinarioides* e *B. rubescens* como espécies usualmente monoicas, ou ainda, monoica ou dioica. Uma análise mais detalhada

na estrutura das inflorescências, determinou que ambas as espécies apresentam mais de um arranjo de sexualidade em seus indivíduos, portanto não são espécies monoicas.

B. parinarioides subsp. *parinarioides* exibe sistema sexual trioico. A maioria dos indivíduos apresentam inflorescências bissexuais, mas em menor proporção, observamos indivíduos com inflorescências unissexuais, estaminadas ou pistiladas, portanto a espécie apresenta três arranjos possíveis de sexualidade. *Brosimum rubescens* é uma espécie androdioicia, indivíduos bissexuais são em maior proporção, mas alguns apresentam apenas pequenas inflorescências estaminadas, com número menor de flores quando comparada as inflorescências bissexuais.

1.4.2 Relações Filogenéticas

A monofilia do grupo neotropical arbóreo de Dorstenieae corrobora com os resultados obtidos por Datwyler & Weiblen (2004), Zerega *et al.* (2005), Silva (2007) e Zhang *et al.* (2019).

Nossos resultados confirmam o parafiletismo do gênero *Brosimum*, uma vez que o clado também inclui os gêneros *Helianthostylis* e *Trymatococcus*. Em função disso, respeitando a prioridade de publicação, sugerimos a transferência dos gêneros *Helianthostylis* e *Trymatococcus* para *Brosimum*.

O distanciamento entre as subespécies de *B. parinarioides* indica que *B. parinarioides* subsp. *amplicomma* pode se tratar de uma outra espécie. Diferenças morfológicas também são claramente observadas entre as subespécies. *Brosimum parinarioides* subsp. *parinarioides* apresenta folhas ligeiramente menores, densamente pubescente na face abaxial e margem inteira, além de exibir três formas distintas de sexualidade da inflorescência (trioicia) e flores estaminadas sempre com perianto. Por sua vez, *B. parinarioides* subsp. *amplicomma* possui folhas maiores, de margem repanda, tricomas na face abaxial escassos e ausentes sobre as veações, além de inflorescências sempre bissexuais com flores estaminadas sem perianto. Uma análise morfométrica detalhada de um número maior de amostras é necessária para uma provável nova combinação para espécie dessas duas subespécies.

Apesar de uma menor amostragem dos táxons, a árvore proposta por Zhang *et al.* (2019) descreve três cladogramas, um deles referente a *Brosimum* subgen. *Brosimum*, outro a *Brosimum* subgen. *Ferolia*, e um terceiro clado relativo aos gêneros *Helianthostylis* e *Trymatococcus*. Nosso resultado confirmou apenas *Brosimum* subgen. *Brosimum* como

monofilético, *Ferolia* não forma um grupo natural devido ao posicionamento de *B. parinarioides* subsp. *parinarioides*.

Brosimum multinervium e *Brosimum longifolium*, espécies não amostradas em nossas análises, demonstram relação próxima às espécies pertencentes ao subgênero *Ferolia* (Silva, 2007; Zhang *et al.* 2019).

1.4.3 EVOLUÇÃO DOS SISTEMAS SEXUAIS

A dioicia é considerada o estado ancestral das espécies de Moraceae (Weiblen, 2000; Datwyler e Weiblen, 2004; Clemente e Weiblen, 2009) e, apesar da nossa reconstrução não revelar a sexualidade do ancestral do grupo, estudos anteriores demonstram que a monoicia é o estado ancestral do de *Brosimum*, *Helianthostylis* e *Trymatococcus* (Zhang *et al.* 2018). Assumindo a monoica como caráter ancestral de Dorstenieae, nossos dados sugerem que dentro do clado ocorreram ao menos seis mudanças de sistemas sexuais: uma transição da monoicia para trioicia; duas para a androdioicia; além de três reversões para a dioicia, estado ancestral em Moraceae.

Nossos resultados demonstram que todos os sistemas sexuais dimórficos originam de ancestrais monoicos no clado neotropical arbóreo de Dorstenieae.

A androdioicia em Dorstenieae surge a partir da monoicia, diferentemente de espécies androdioicas das famílias Datisceae e Euphorbiaceae (Rieseberg *et al.* 1992; Pannel, 1999; Wolfe, 2001). Nesses casos a androdioicia teria evoluído da dioicia a partir da aquisição da função masculina pelas plantas pistiladas, onde plantas com flores femininas em populações dioicas são aparentemente convertidas na forma hermafrodita por uma mutação recessiva que permite às fêmeas produzir pólen (Barett, 2002).

Apesar da coexistência de monoicia, androdioicia e dioicia no clado arbóreo neotropical de Dorstenieae, nossos resultados confirmam que a androdioicia não é um intermediário na evolução da dioicia (Barett, 2002). Charlesworth (1984) propõe que na evolução da dioicia a partir de um ancestral monoico, a prevenção da consanguinidade é um fator importante, o que torna pouco provável a evolução da dioicia via androdioicia.

Além disso, o termo androdioicia vem sido empregado para diferentes arranjos florais. Na definição clássica, androdioicia inclui indivíduos com flores bissexuais (hermafroditas) coexistindo com outros que apresentam apenas flores estaminadas (Sakai e Weller, 1999; Cardoso *et al.* 2018). Porém, o termo também é usado para designar espécies com indivíduos bissexuais (flores unissexuadas, estaminadas e pistiladas, agrupadas em

inflorescências bissexuais) e indivíduos apenas com flores estaminadas, como é caso em Moraceae.

Assim sendo, arranjos androdioicos envolvem caminhos evolutivos distintos. A androdioicia pode surgir a partir de uma população dioica pela expressão da sexualidade masculina em flores pistiladas (Charlesworth, 1999), como é o caso de Datisceae e Euphorbiaceae (Rieseberg *et al.* 1992; Pannel, 1999, Wolfe, 2001). Resultando em indivíduos da população com flores bissexuais coexistindo com indivíduos com apenas flores estaminadas. Já em Moraceae, a androdioicia pode ser resultado da supressão da expressão de flores estaminadas em populações monoicas, ou da expressão de flores estaminadas em populações dioicas.

Em Dorstenieae, a androdioicia surge a partir do desaparecimento de flores pistiladas em parte de uma população monoica, resultando em indivíduos bissexuais, porém com flores sempre unissexuadas, além de indivíduos que expressam apenas flores estaminadas em suas inflorescências.

Em *Castilla elastica* (Castilleae), a origem da androdioicia não é clara (Zhang *et al.* 2018), porém, o fato de espécies intimamente relacionadas serem androdioicas e outras espécies do gênero dioicas, indica que a androdioicia teria evoluído a partir da dioicia (Sakai, 2001). *Castilla elastica*, é polinizada por pequenos insetos conhecidos como tripes (Thysanoptera), esses insetos utilizam como principal recurso floral os grãos de pólen (Sakai 2001), o que pode explicar a manutenção de flores estaminadas em inflorescências de função pistilada.

Tripes também são reportados como visitantes em outros gêneros da tribo Castilleae como: *Antiaropsis*, *Naucleopsis*, *Perebea* e *Poulsenia* (Sakai, 2001; J.E.L.S. Ribeiro, Universidade Estadual de Londrina, “comunicação pessoal”).

A androdioicia em *H. sprucei* e *H. steyermarkii* deriva de uma ancestral também androdioico, o que sugere a manutenção da sexualidade no gênero. Espécies de *Helianthostylis* possuem flores estaminadas com longo pistilódio que podem desempenhar papel de atração de insetos polinizadores (Berg, 2001).

A evolução da dioicia a partir da monoicia ocorre em três momentos em *Brosimum*. Um dos fatores que poderia levar ao dimorfismo a partir de espécies monoicas é a perda de polinizadores. A ausência de polinizadores ocasionaria depressão endogâmica gerada pelo auto cruzamento, que favoreceria a seleção da dioicia e a polinização pelo vento (Weller e Sakai, 1990; Weller *et al.* 1990).

Espécies dioicas de *Brosimum* tendem a possuir estigmas de maior comprimento e número de flores estaminadas muito maiores do que espécie monoicas, o que indica uma possível adaptação a polinização pelo vento. Apesar de não existir evidência da relação entre sistemas reprodutivos e a síndrome de polinização em Moraceae (Clement e Weiblen, 2009), um padrão geral pode ser observado: táxons dioicos tendem a ser polinizados pelo vento, enquanto os táxons monoicos, tendem a ser polinizados por insetos (Zhang *et al.* 2019).

Brosimum parinarioides subsp. *parinarioides* é apresentado como o primeiro registro de trioícia em Moraceae, espécies trioicas apresentam indivíduos bissexuais coexistindo com indivíduos estaminados e indivíduos pistilados na mesma população (Sakai e Weller, 1999).

Trioícia é extremamente incomum em angiospermas (Webb, 1999), sendo relatada em *Opuntia robusta* J.C. Wendl. e *Pachycereus pringlei* (S.Watson) Britton & Rose (Cactaceae), além de *Coccoloba cereifera* Schwacke (Polygonaceae) e *Dasiphora fruticosa* auct. (Rosaceae) (del Castillo e les-Espinoza, 1988; Fleming *et al.* 1998; Silva *et al.* 2008; Wang *et al.* 2019). Contudo, todas essas espécies todas as espécies tríóicas apresentam indivíduos com flores bissexuais, hermafroditas, diferentemente de *B. parinarioides* que possui inflorescências bissexuadas e flores sempre unissexuadas, o que torna a trioícia em Moraceae única.

1.5 CONCLUSÕES

Brosimum, *Helianthostylis* e *Trymatococcus* apresentam quatro sistemas sexuais. A maioria das espécies de *Brosimum* são monoicas, com uma ou poucas flores pistiladas, rodeadas por flores estaminadas, e o mesmo ocorre para as espécies de *Trymatococcus*. A dioícia está presente em cinco espécies de *Brosimum*. Androdioícia foi conferida nas espécies de *Helianthostylis* e em *B. rubescens*, enquanto a trioícia foi verificada em *B. parinarioides* subsp. *parinarioides* pela primeira vez em Moraceae.

Brosimum, *Helianthostylis* e *Trymatococcus* formam um agrupamento monofilético, assim como os gêneros *Helianthostylis* e *Trymatococcus*. Todavia *Brosimum* se revela parafilético. Portanto, devido à posição de *Helianthostylis* e *Trymatococcus* no mesmo clado de *Brosimum*, recomendamos a transferência dos dois gêneros para *Brosimum*.

A reconstrução dos sistemas sexuais não foi suficiente para revelar o estado ancestral do grupo arbóreo neotropical de Dorstenieae, mas assumindo a condição monoica ancestral verificada por outros autores, observamos seis transições para sistemas dimórficos,

sendo: uma conversão da monoiccia para trioiccia, duas para androdioiccia e três reversões para dioiccia, estado ancestral em Moraceae.

Podemos também concluir que sistemas sexuais que apresentam redução ou ausência de uma das funções sexuais, como a androdioiccia e a trioiccia, não representam sistemas transitórios para dioiccia em Dorstenieae, já que todos os sistemas dimórficos, incluindo a dioiccia, teriam evoluído a partir de sistemas monomórficos.

AGRADECIMENTOS

Nós agradecemos a todos os integrantes do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina. Aos curadores dos herbários INPA, PDBFF, FUEL e FCAB, pela receptividade e materiais emprestados. A toda a equipe do Projeto Dinâmica Biológica de Fragmentos Florestais (PDBFF) do Instituto de pesquisas da Amazônia (INPA) pelo auxílio em campo. E a todos os integrantes do Laboratório de Genética e Ecologia Animal da UEL pelo amparo nas análises moleculares.

FINANCIAMENTO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e Auxílio de Pesquisa Thomas Lovejoy, uma parceria entre o Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e o Smithsonian Institution dos Estados Unidos.

1.6 LITERATURA CITADA

Akaike H. 1974. A New Look at the Statistical Model Identification. *IEEE Transactions on Automatic Control* 19(6): 716-723.

Barrett SCH. 2002. The evolution of plant sexual diversity. *Nature Reviews. Genetics* 3: 274-284.

Bawa KS. 1980. Evolution of dioecy in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 11: 15-39.

Berg CC. 1972. *Olmedieae and Brosimeae. Flora Neotropica*. Hafner Publishing Company: New York.

- Berg, CC. 1990. Differentiation of flowers and inflorescences of Urticales in relation to their protection against breeding insects and to pollination. *Sommerfeltia* 11: 13–24.
- Berg, C.C. 2001. *Morae, Artocarpae and Dorstenia (Moraceae): with introductions to the family and Ficus and with additions and corrections*. Flora Neotropica. New York Botanical Garden, New York.
- Bollback J. 2006. SIMAP: Stochastic character mapping of discrete traits on phylogenies. *BMC Bioinformatics* 7(1): 88
- Bull JJ, Charnov EL. 1985. On irreversible evolution. *Evolution*, 39(5): 1149–1155.
- Cardoso JCF, Viana ML, Matias R *et al.* 2018. Towards a unified terminology for angiosperm reproductive systems. *Acta Botanica Brasilica* 32(3): 329–348.
- Charlesworth B, Charlesworth D. 1978. A model for the evolution of dioecy and gynodioecy. *The American Naturalist* 112: 975-997.
- Charlesworth D. 1984. Androdioecy and the evolution of dioecy. *Biological Journal of the Linnean Society* 22(4): 333–348.
- Charlesworth, D. 1999. Theories of the Evolution of Dioecy. In: Gaber MA, Dawson TE, Delph LF, eds. *Gender and Sexual Dimorphism in Flowering Plants*, Springer-verlag Berlin Heidelberg, Germany, 33–60.
- Clement WL, Weiblen GD. 2009. Morphological evolution in the mulberry family (Moraceae). *Systematic Botany* 34: 530–552.
- Croat, TB. 1978. *Flora do Barro Colorado Island*. Stanford University Press, California, USA.
- Darwin CR. 1877. *The different forms of flowers on plants of the same species*. London, John Murray.
- Datwyler SL, Weiblen GD. 2004. On the origin of the fig: phylogenetic relationships of Moraceae from ndhF sequences. *American Journal of Botany* 91: 767–777.
- Del Castillo RF, González-Espinoza M. 1988 Una interpretación evolutiva del polimorfismo sexual de *Opuntia robusta* (Cactaceae) *Sobretiro Agrociencia* 71: 185-196.
- Farris JS, Källersjö M, Kluge AG, Bult C. 1994. Testing significance of incongruence. *Cladistics* 10 (3): 315-319.

Fleming TH, Maurice S, Hamrick JL. 1998. Geographic variation in the breeding system and the evolutionary stability of trioecy in *Pachycereus pringlei* (Cactaceae). *Evolutionary Ecology* 12(3): 279–289.

Miller MA, Pfeiffer W, Schwartz T. 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. Gateway Computing Environments Workshop.

Pannell JP. 1997. Mixed genetic and environmental sex determination in an androdioecious population of *Mercurialis annua*. *Heredity* 78, 50–56.

R Development Core Team 2009. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. www.R-project.org.

Rambaut A, Suchard MA, Xie W, Drummond AJ. 2013. Tracer v.1.6.0: MCMC Trace Analysis Tool. <http://beast.bio.ed.ac.uk>.

Revell LJ. 2011. phytools: an R package for phylogenetic comparative biology (and other things). *Methods in Ecology and Evolution* 3(2): 217–223.

Ribeiro JELS. 2007. *Estudos sobre filogenia, taxonomia e evolução de caracteres reprodutivos em Moraceae Gaudich*. Tese de doutorado. Universidade de Campinas, Brasil.

Rieseberg LH, Hanson MA, Philbrick CT. 1992. Androdioecy is Derived from Dioecy in Datisceae: Evidence from Restriction Site Mapping of PCR-Amplified Chloroplast DNA Fragments. *Systematic Botany* 17(2): 324.

Rohwer JG, 1993. Moraceae. In: Kubitzki K, Rohwer JG, Bittrich V, Eds. *The Families and Genera of Vascular Plants*. Springer-Verlag: Berlin, 438–453.

Sakai S. 2001. Thrips pollination of androdioecious *Castilla elastica* (Moraceae) in a seasonal tropical forest. *American Journal of Botany* 88: 1527–1534.

Sakai AK, Weller SG. 1999. Gender and sexual Dimorphism in Flowering Plants: A review of terminology, Biogeographic Patterns, Ecological Correlates, and Phylogenetic Approaches. In: Geber MA, Dawson TE, Delph LF, eds. *Gender and Sexual Dimorphism in Flowering Plants*. Springer-Verlag: Heidelberg, 1-31.

Silva, CA; Oliva MA; Vieira MF, Fernandes GW. 2008. Trioecy in *Coccoloba cereifera* Schwacke (Polygonaceae), a narrow endemic and threatened tropical species. *Braz. arch. biol. technol.* 51(5): 1003-1010.

Silva WS. 2007. *Sistemática filogenética dos gêneros neotropicais da tribo Dorstenieae Dumort. Brosimum Sw, Helianthostylis Baillon e Trymatococcus Poepp. & Endl. (MORACEAE)*. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Amazonas, Brasil.

- Wang LL, Zhang ZQ, Yang YP, Duan YW. 2019. The coexistence of hermaphroditic and dioecious plants is associated with polyploidy and gender dimorphism in *Dasiphora fruticosa*. *Plant Diversity*. 41 (5): 323-329.
- Webb CJ. 1999. Empirical studies: evolution and maintenance of dimorphic breeding systems. In: Gaber MA, Dawson TE, Delph LF, eds. *Gender and Sexual Dimorphism in Flowering Plants*, 61–95.
- Weeks SC, Chapman EG, Rogers DC, Senyo DM, Hoeh WR. 2009. Evolutionary transitions among dioecy, androdioecy and hermaphroditism in limnadiid clam shrimp (Branchiopoda: Spinicaudata). *Journal of Evolutionary Biology* 22: 1781–1799.
- Weiblen GD, Oyama RK, Donoghue MJ. 2000. Phylogenetic analysis of dioecy in monocotyledons. *The American Naturalist* 155: 46-58.
- Weller SG, Sakai AK. 1990. Evolution of dicliny in the endemic Hawaiian Caryophyllaceae. *Plant Species Biology* 5: 83-95.
- Weller SG, Sakai AK, Wagner WL, Herbst DR. 1990. Evolution of dioecy in *Schiedea* (Caryophyllaceae: Alsinoideae) in the Hawaiian Islands. Biogeographical and ecological factors. *Systematic Botany* 15: 266-276.
- White TJ, Bruns TD., Lee SB, Taylor. JW. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ., White TJ, eds. *PCR protocols: A guide to methods and applications*, Academic Press, San Diego, California. 315–322.
- Wolfe DE, Satkoski JA, White K, Rieseberg LH. Sex determination in the androdioecious plant *Datisca glomerata*, and its dioecious sister species, *D. cannabina*. *Genetics* 159: 1243–1257 .
- Zerega NJC, Clement WL, Datwyler SL, Weiblen GD, 2005. Biogeography and divergence times in the mulberry family (Moraceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 37: 402–416.
- Zhang, Q, Onstein RE, Little SA, Sauquet H. 2018. Estimating divergence times and ancestral breeding systems in Ficus and Moraceae. *Annals of Botany* 23(1): 191-204.
- Zhang Q, Zerega N, Sauquet H. 2019. Long-distance dispersal shaped the diversity of tribe Dorstenieae (Moraceae) – *bioRxiv*, in press. doi: 10.1101/531855.

2 CAPÍTULO 2

Biologia reprodutiva de *Brosimum gaudichaudii* Trécul, um novo registro de polinização por tripes (Thysanoptera) em Moraceae.

RESUMO

Brosimum gaudichaudii Trécul (Moraceae) é uma espécie monoica, de hábito arbustivo arbóreo endêmica do Cerrado brasileiro. Aqui relatamos o primeiro registro de polinização por tripes em um membro de Dorstenieae, e o terceiro registro para família Moraceae. Usamos medidas fenológicas, observações e captura de insetos e cruzamentos testes para investigar o modo de reprodução e polinização em *B. gaudichaudii*. Registramos *Haplothrips fiebrigi* Priesner, 1931 alimentando-se de pólen, reproduzindo-se nos ápices dos ramos e depositando seus ovos em inflorescências em estágio inicial de desenvolvimento. Ninfas se desenvolvem sobre as inflorescências antes da antese das flores, aparentemente se alimentando do tecido epidérmico. Quando adultos, tripes transportam grãos de pólen ativamente entre inflorescências em fase estaminada e pistilada. Combinamos essas observações com evidências morfológicas para sugerir que, assim como em *Castilla* (Castilleae), a polinização por tripes pode ser comum em espécies de *Brosimum* (Dorstenieae).

Palavras-chave: Dorstenieae; polinização; tripes; reprodução; mama-cadela.

2.1 INTRODUÇÃO

A família Moraceae compreende 40 gêneros e mais de 1.200 espécies. Destas, aproximadamente 800 são do gênero *Ficus*.

Em *Ficus*, gênero amplamente reconhecido por suas inflorescências esféricas e fechadas (sicônio), insetos (Agaonidae, Hymenoptera) possivelmente evoluíram de predadores a polinizadores extremamente especializados (Bronstein e McKey, 1989; Anstett et al., 1997; Weiblen, 2002; Cook e Rasplus, 2003; Cruaud et al., 2012).

Em Moraceae a condensação progressiva das inflorescências por fusão e redução de peças florais é uma tendência evolutiva que pode ter ocorrido devido a pressão exercida por insetos predadores de tecidos florais (Berg, 1989; Rohwer, 1993).

Recentemente, outros gêneros de Moraceae tiveram seus sistemas reprodutivos elucidados, o que trouxe evidências da participação de outras ordens de insetos agindo como polinizadores específicos. Em *Artocarpus*, inflorescências masculinas são contaminadas por fungos que servem de recompensa para polinizadores (Cecidomyiinae, Diptera) (Sakai et al., 2000). Em *Antiaropsis e Castilla*, tripes (Thysanoptera) alimentam-se de pólen reproduzindo-se nas inflorescências estaminadas (Sakai, 2001; Zerega et al., 2004).

Estudos como esses são relevantes para compreendermos a evolução e a diversificação dos sistemas de reprodução em angiospermas (Sakai e Weller, 1999; Silva, 2007; Judd et al., 2009).

Brosimum gaudichaudii Trecul (Moraceae) é uma espécie monoica, de hábito arbustivo arbóreo, típica do Cerrado Brasileiro, mas que ocorre em vegetações secas espalhadas por todas as regiões do Brasil, além de Bolívia e Paraguai (Berg, 1972; Ribeiro e Pederneiras, 2020).

As inflorescências de *B. gaudichaudii* são extremamente reduzidas, globosas e recoberta por inúmeras escamas peltadas revestidas de tricomas glandulares. O pequeno tamanho das inflorescências fez com que ficasse conhecida popularmente como “Mamacadela”, em referência a pequenos mamilos em cães. Suas flores são diminutas e imersas no receptáculo, apenas uma flor pistilada com um único óvulo é localizado no centro da inflorescência, ao redor da flor pistilada surgem gradativamente diversas flores estaminadas. Fig. 6) (Berg, 1972).

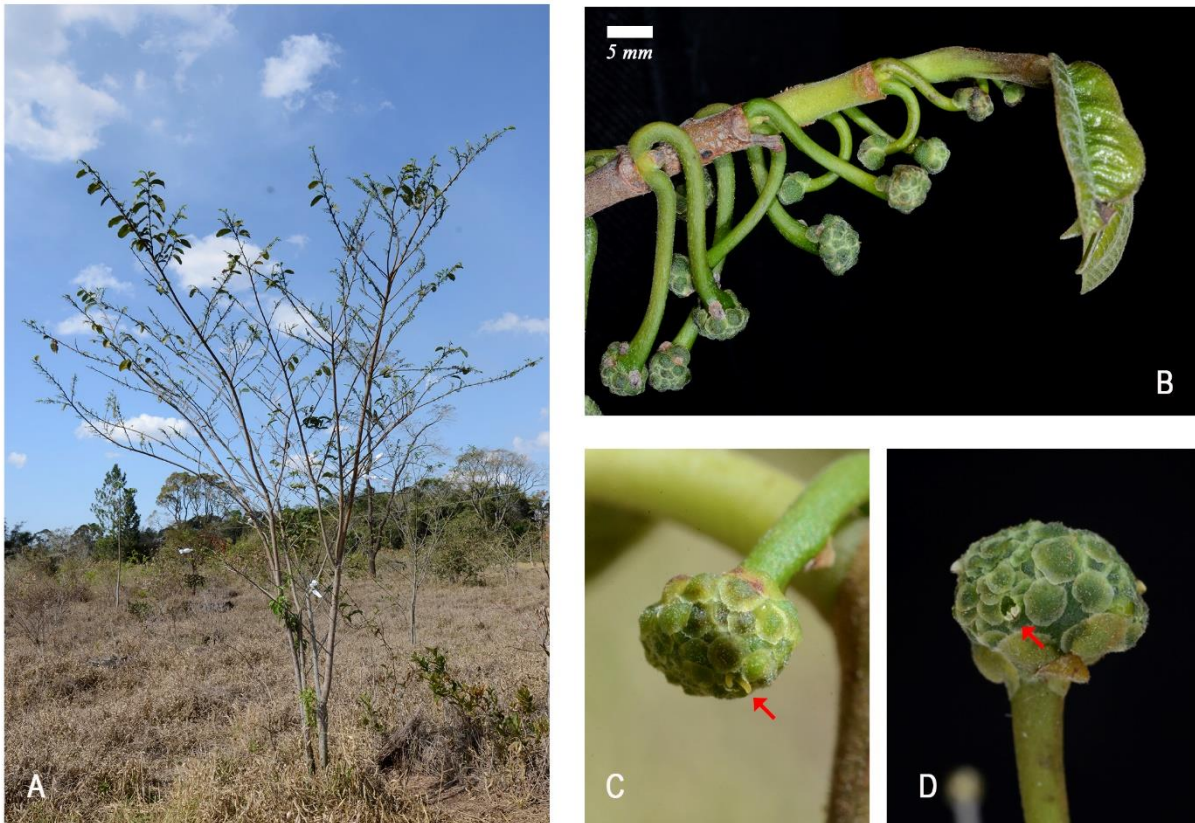


Figura 6 - *Brosimum gaudichaudii*, hábito (A); inflorescências (B); seta vermelha indica flor pistilada em (C); flor estaminada em (D).

Apesar de ser uniovolado e aparentemente não fornecer recursos florais abundantes, as inflorescências de *Brosimum* não aparentam ter adaptações para a polinização pelo vento (Berg, 1972). As flores estaminadas inseridas em uma cavidade expõem somente as anteras entre as escamas durante a antese (Fig. 6, D) e o estigma é extremamente reduzido (Fig. 6, C), não favorecendo a autopolinização. Portanto suas características indicariam uma possível adaptação a polinização por insetos (Judd et al., 2009; Berg, 2001).

Brosimum gaudichaudi apresenta floração sazonal e sincronismo de floração entre as plantas. A intensidade de floração é alta, mas a produção de frutos é extremamente baixa (de Faria et al., 2015).

Nesse cenário, o presente estudo tem como objetivo descrever a biologia reprodutiva de *Brosimum gaudichaudii*, analisando a fenologia de floração, a dinâmica de abertura das flores e o sistema reprodutivo e de polinização da espécie.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Área de Estudo

O estudo foi conduzido na Floresta Estadual de Assis (FEA), município de Assis, estado de São Paulo, Brasil (22°34'49" S 50°25'12" O) durante maio de 2016 a julho de 2018.

O clima da região é subtropical úmido, com invernos secos e temperaturas dos meses mais frios inferiores a 18° C, e nos meses mais quentes alcança temperaturas superiores a 22° C. A precipitação anual gira em torno de 1480 mm, sendo que nos meses mais secos normalmente ultrapassa 40mm.

A FEA é uma unidade de conservação de uso sustentável, que compreende 1.310,27 ha, predominantemente de Cerrado lato sensu (Cerradão) e áreas de transição para a Floresta Estacional Semidecidual, além de 450,37 ha constituídos por antigos talhões de *Pinus* e *Eucaliptus* sob manejo. Em diversas áreas abandonadas pelo cultivo de *Pinus* o Cerrado se encontra em diferentes estágios de regeneração (Durigan, 2010).

Brosimum gaudichaudii é uma espécie de áreas abertas de Cerrado. Na FEA é encontrada em abundância nas bordas e áreas em regeneração de vegetação nativa, além das margens de estradas (aceiros) dos talhões de monocultivo de *Pinus*, regiões onde a vegetação é sazonalmente suprimida.

2.2.2 Fenologia e Biologia Floral

Em 2016, seguindo protocolo proposto por Dafni (1992), foram feitas observações preliminares da fenologia e biologia floral para a elaboração mais precisa do método de pesquisa. A receptividade do estigma foi testada por meio da atividade da peroxidase usando peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

Após esse período, quarenta e seis plantas em estágio reprodutivo foram selecionadas e acompanhadas quinzenalmente, do início da floração em junho de 2017 ao final da floração em de fevereiro de 2018.

Todas as plantas foram quantificadas quanto à atividade de floração, indicando a proporção de indivíduos em floração ou em determinada fenofase, sendo: 1. inflorescências em fase pistilada (antese apenas da flor pistilada); 2. inflorescências em fase

pistilada e estaminada (presença de flor pistilada e estaminadas em antese); 3. inflorescências em fase estaminada (antese apenas das flores estaminadas).

Também foram calculados o percentual de intensidade de floração de Fournier, no qual os indivíduos foram analisados em uma escala semi-quantitativa que varia de 0 a 4, onde: 0 = ausência da floração; 1 = presença de floração entre 1% e 25% de magnitude; 2 = presença de floração entre 26% e 50% de magnitude; 3 = presença de floração entre 51% e 75% de magnitude; 4 = presença de floração entre 76% e 100% de magnitude. (Fournier 1974).

O momento de floração de *B. gaudichaudii* foi quantificado pela medição de 30 inflorescências em seis indivíduos durante 52 dias. Em média as medições foram feitas a cada três dias durante esse período. As inflorescências foram medidas em seu maior diâmetro com o paquímetro digital e categorizadas como: 1 = inflorescência estéril, sem flores em antese (Fig. 7, A); 2 = inflorescência em fase pistilada, flor pistilada com estigma receptivo (Fig. 7, B); 3 = inflorescência em fase estaminada, apenas antese de flores estaminadas (Fig. 7, C e D).



Figura 7 – Inflorescência de *Brosimum gaudichaudii* em pré-antese (A), fase pistilada (B), fase estaminada (C, D).

2.2.3 OBSERVAÇÃO E COLETA DE VISITANTES FLORAIS

Flores e visitantes florais em inflorescências de *Brosimum* foram observadas de julho a novembro de 2017 por um total de 120 horas, incluindo quatro horas de observação no período noturno.

Visitantes de inflorescências foram coletados por amostragem aleatória de 72 ramos terminais contendo inflorescências férteis em 20 indivíduos de *B. gaudichaudii* entre os períodos de maior atividade de floração. Insetos coletados em inflorescências foram preservados em solução de AAG (60% de álcool, ácido acético glacial e glicerina nas proporções 10: 1: 1) para estudo taxonômico.

Armadilhas adesivas foram colocadas perto das inflorescências para coletar e comparar densidades populacionais de visitantes florais. As armadilhas foram construídas com plástico transparente (10x10 cm) com uma fina camada de cola adesiva para insetos.

As armadilhas foram afixadas em ramos com barbantes e orientadas perpendicularmente ao eixo de inflorescência a uma distância de aproximadamente 2 cm das flores. O estudo incluiu 27 armadilhas em inflorescências em fase reprodutiva e 9 armadilhas de controle, localizadas nas árvores sem inflorescência. Para comparar a densidade de visitantes entre plantas em floração e plantas estéreis (controle), armadilhas foram mantidas por 20 dias nas árvores.

Os insetos aderidos às armadilhas foram morfotipados e contados. A abundância entre ordens de artrópodes foi comparada usando testes t de Student, valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

2.2.4 Experimentos de Polinização e Sucesso Reprodutivo

Os testes de polinização controlada foram realizados com 20 indivíduos. Em todos os testes, inflorescências imaturas foram isoladas e envolvidas em saco de papel semipermeável e, posteriormente, submetidas aos seguintes tratamentos: 1 = **agamospermia** (inflorescências tiveram o estigma da flor pistilada cauterizado com ferro aquecido); 2 = **autopolinização espontânea** (inflorescências previamente ensacadas foram deixadas intactas sem qualquer interferência); 3 = **autopolinização manual** (inflorescências previamente ensacadas, após antese da flor pistilada, foram polinizadas manualmente com pólen da própria planta); 4 = **polinização cruzada** (inflorescências previamente ensacas foram polinizadas manualmente com pólen proveniente de diferentes indivíduos).

Para quantificar o potencial e o sucesso reprodutivo em condições naturais, foi calculado o sucesso reprodutivo pré-emergente (SRPE) através da razão entre frutos e inflorescências produzidas por indivíduo ($n=60$) (Wiens et al., 1987).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Fenologia e Biologia Floral

Todos os indivíduos de *B. gaudichaudii* estudados apresentaram inflorescências bissexuadas. A inflorescências de *Brosimum* são protoginicas. A flor pistilada, geralmente única e central, entra em antese quando a inflorescência alcança aproximadamente 4 mm de diâmetro e permanece receptiva por aproximadamente 12 dias. Após esse tempo, iniciam a abertura de sucessivas flores masculinas, que perduram pelos próximos 13 dias. Em média são produzidas 14 flores estaminada por inflorescência que entram em antese gradualmente, iniciando a abertura nas extremidades da inflorescência em direção ao centro. O desenvolvimento total da inflorescência dura em média 42 dias. (Fig. 8)

As inflorescências de *B. gaudichaudii* podem exibir variação quanto ao comprimento do pedúnculo da inflorescência, tamanho da inflorescência (5,4 – 7,2 mm), número de flores estaminadas (7-26) e pistiladas (1-3) e comprimento e exposição do pistilo.

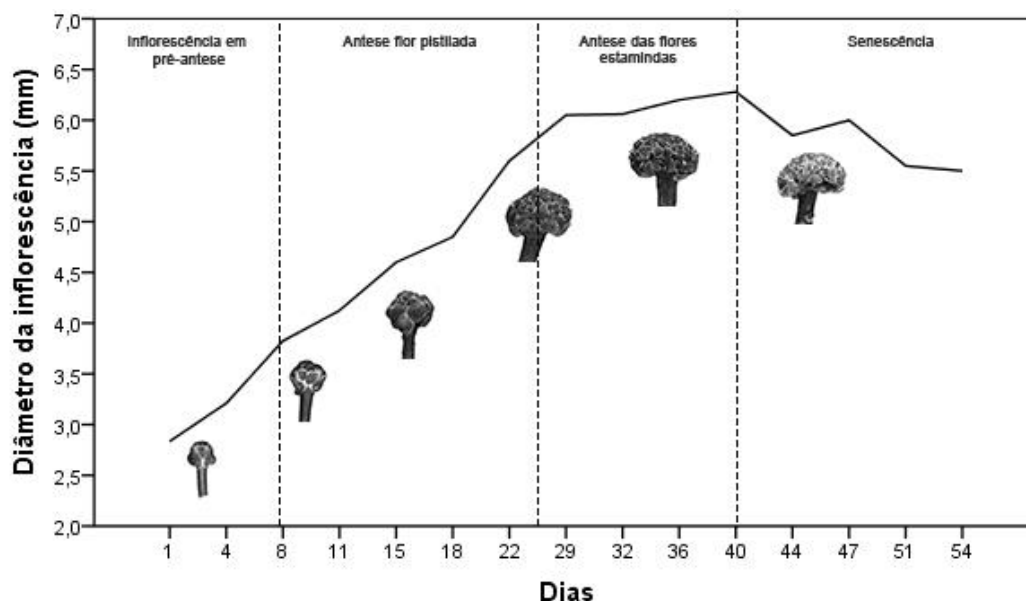


Figura 8 - Biologia floral de *Brosimum gaudichaudii* com estágios de desenvolvimento indicado.

O tamanho da inflorescência durante o desenvolvimento variou em média de 2,8 mm a 6,6 mm de largura. A maioria das inflorescências apresentam apenas uma flor pistilada, mas dois dos sessenta indivíduos observados possuíam duas ou três flores pistiladas por inflorescência. A liberação de odor suave e adocicado foi observado em diversas ocasiões,

sempre entre 17 e 19 horas, sendo mais perceptível em dias mais quentes e de menos vento.

A atividade de floração de *B. gaudichaudii* ocorreu entre os meses de junho a janeiro. A intensidade de floração foi maior entre os meses de setembro e outubro (<70%) com pico de intensidade no mês de setembro (Fig. 9).

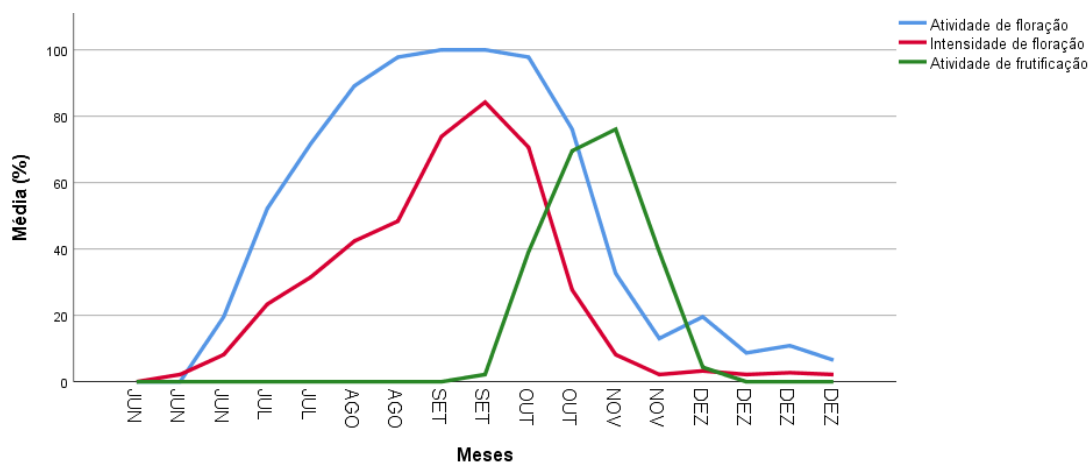


Figura 9 - Índice de atividade e intensidade de floração e frutificação de *B. gaudichaudii*, São Paulo, Brasil em 2017.

Plantas com flores estaminadas e pistiladas em antese simultaneamente só passam a ser maioria nos meses de agosto e setembro. A partir da segunda quinzena de outubro apenas flores estaminadas estão em antese.

A formação de frutos só foi observada a partir do mês de setembro, com maior atividade no mês de outubro e novembro.

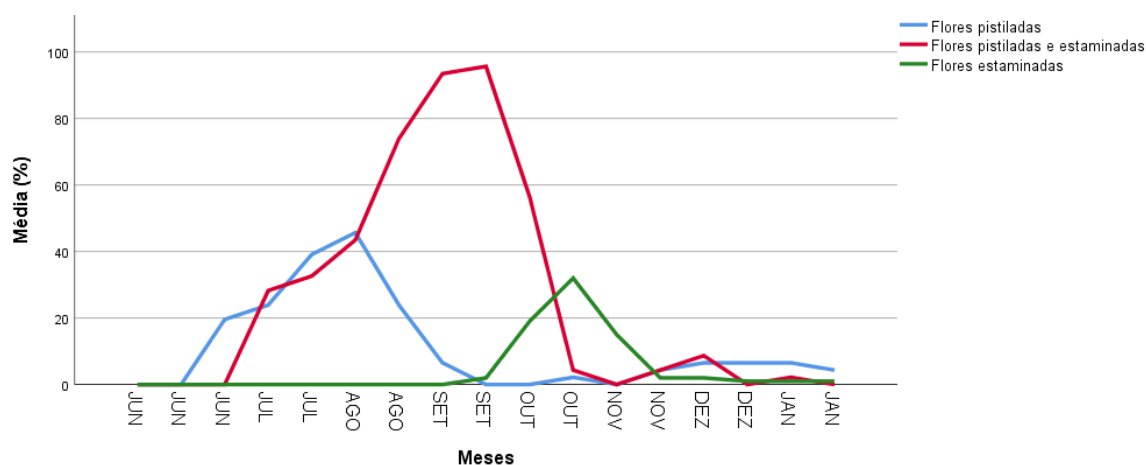


Figura 10 - Índice de atividade por fenofase de floração de *B. gaudichaudii*, São Paulo, Brasil em 2017.

Quando analisamos a fenofases de floração separadamente, observamos que

no início, entre os meses de junho a agosto, a atividade de floração ainda é pequena, e devido a protoginia, apenas metade das plantas encontram-se em fase estaminada (Fig.10). Durante esses meses não foi observado a formação de frutos.

2.3.2 Observação e Coleta de Visitantes Florais

Brosimum gaudichaudii aparenta baixa atividade de visitantes, apenas quatro espécies de artrópodes visitam suas inflorescências. *Apis melifera* Linnaeus 1758 visita ocasionalmente inflorescências e ramos terminais coletando látex durante as horas mais quentes do dia. Duas espécies de Diptera visitam inflorescências durante o início da floração, contudo, durante esse período não foi observado a formação de frutos e os espécimes coletados visitando inflorescências não possuíam grãos de pólen aderidos ao corpo.

Apenas *Haplothrips fiebrigi* Priesner, 1931 inseto da ordem Thysanoptera, popularmente conhecidos como tripes, foram observados em diferentes estágios de desenvolvimentos durante toda a floração de *B. gaudichaudii*. Ninfas de tripes aparecem no início da floração, durante os estágios iniciais de desenvolvimento da inflorescência, onde aparentemente se alimentam do tecido epidérmico das inflorescências.

Após a antese das flores estaminadas, estágios ninfais e adultos são observados em todos os indivíduos de *B. gaudichaudii*, em maior ou menor densidade. *Haplothrips fiebrigi* visita ativamente flores estaminadas e pistiladas em busca de grão de pólen, entram na cavidade da flor estaminada, imersa no receptáculo, e se alimentam de pólen ativamente (Fig. 11 e 12).

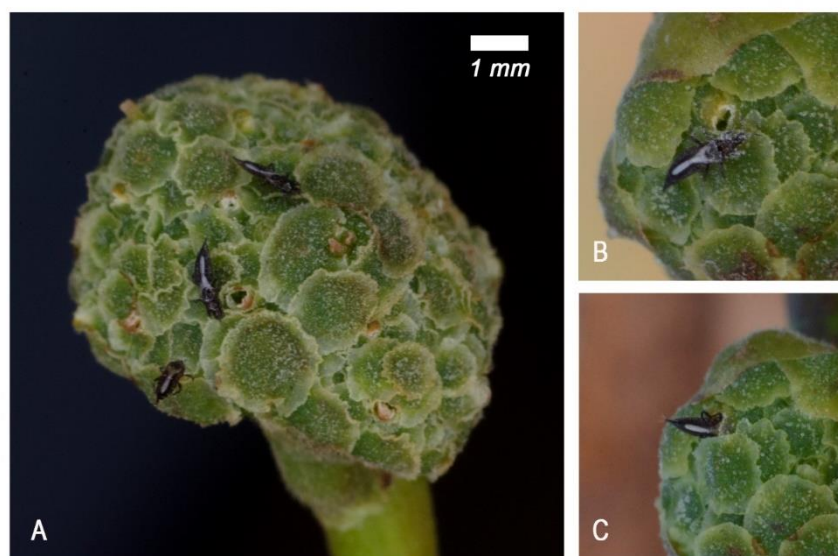


Figura 11 - *Haplothrips fiebrigi* visitando flores estaminadas (A), e recoberto de grãos de pólen (B), após se alimentar no interior da flor estaminada (C).

Durante o período de maior intensidade de floração, adultos circulam entre inflorescência de diferentes fases de desenvolvimento, aglomerando-se e acasalando no ápice dos ramos, onde finalmente depositam seus ovos sobre inflorescências em início de desenvolvimento, ainda protegidas pelas estípulas terminais.

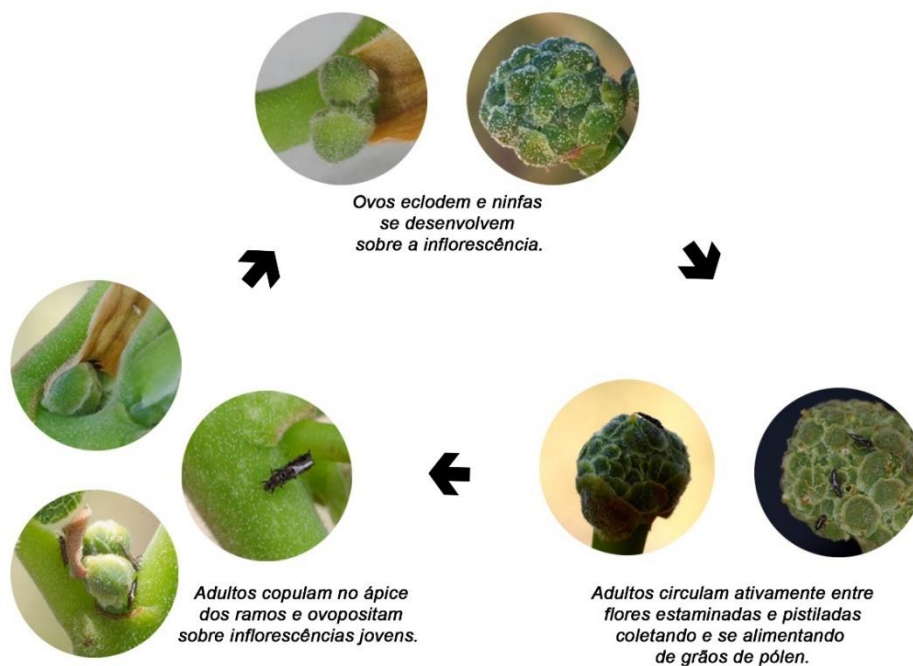


Figura 12 - Ciclo de vida proposto de *Haplothrips fiebrigi* em relação à fenologia de floração de *B. gaudichaudii*.

Tripes estavam em 80% das amostras (n=73) de inflorescências coletadas aleatoriamente durante o mês de setembro.

Diptera foi a ordem mais abundante, porém a abundância média por armadilha não foi significativamente maior para plantas com inflorescências do que para árvores não florescentes, indicando que dípteras não são especificamente visitantes florais.

Thysanoptera foi a segunda ordem com maior frequência nas armadilhas adesivas, sendo a única ordem com diferença significativa ($T(34) = 3,139$; $p = 0,003$) entre plantas férteis e estéreis (Fig. 13).

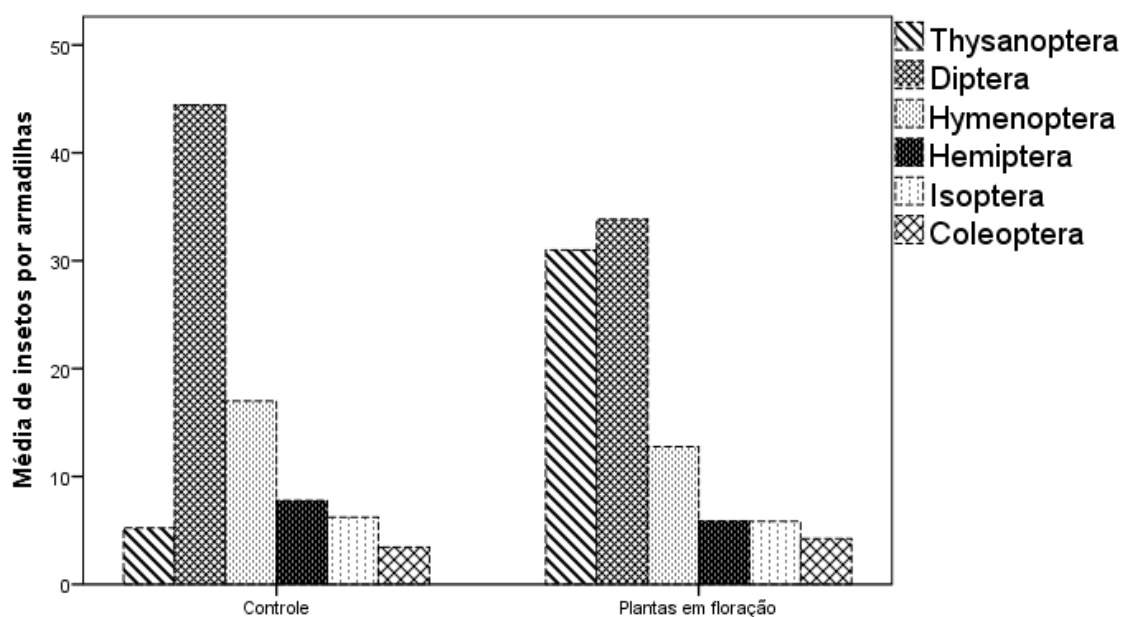


Figura 13 - Média de número de artrópodes em armadilhas pegajosas em plantas em floração e controles.

2.3.3 Experimentos de Polinização e Sucesso Reprodutivo

De um total 355 cruzamentos controlados, apenas o tratamento de “polinização cruzada” obteve sucesso reprodutivo, mostrando que a espécie é auto-incompatível. Mesmo assim, apenas 10% dos tratamentos de polinização cruzada desenvolveram frutos (n=58). Todos os demais tratamentos (agamospermia, autopolinização espontânea, autopolinização manual e controle) não resultaram em formação de fruto.

B. gaudichaudii produziu em média aproximadamente 144 inflorescências e 5,5 frutos por indivíduo, o que resultou em um sucesso reprodutivo de apenas 0,38%.

2.4 DISCUSSÃO

Assim como em outras regiões de Cerrado brasileiro, no estado de São Paulo *B. gaudichaudii* apresentou floração nos meses mais secos do ano, com pico de intensidade no mês de setembro, antecedendo o período de início das chuvas (de Faria et al., 2015). Após dias de chuva durante a floração, foi possível observar uma redução expressiva no número de visitantes florais, indicando que a condição de estiagem pode ser uma fator que favorece a polinização e sucesso reprodutivo da espécie.

Observações de campo juntamente com observações de amostras de herbário mostram que todas as espécies de inflorescências bissexuais do gênero *Brosimum*, incluindo *B.gaudichaudii*. são protogínicas. Protoginia é a não sincronização da antese em flores do mesmo indivíduo, tornando o estigma receptivo antes da liberação dos grãos de pólen (Sakai e Weller 1999; Cardoso et al., 2018)

A separação de pólen e estigmas, em geral, atua reduzindo a auto-interferência entre eles e, muitas vezes, também a auto-fertilização. Apesar de muitas espécies dicogâmicas serem também auto-incompatíveis, esses mecanismos propiciam principalmente um aumento da produção de frutos e sementes, uma vez que todos os indivíduos são doadores de pólen e também produtores de frutos. Espécies nas quais os polinizadores ocupam uma flor por um período prolongado costumam ser protóginas, de modo que o pólen possa ser depositado na entrada e removido na saída (Lloyd, 1976).

Variações quanto ao tamanho da inflorescência e número de peças florais são observadas e descritas em outras espécies de *Brosimum* (Berg, 1972). O tamanho e número total de flores estaminadas produzidas por uma única inflorescência em *B. gaudichaudii* parece estar relacionado com a disponibilidade de recursos, que propiciam um maior ou menor desempenho na floração. O número de flores pistiladas aparentemente é fixo nas espécies de *Brosimum*. *Brosimum gaudichaudii* possui uma única flor pistilada, mas em alguns poucos indivíduos foram verificadas duas ou três flores pistiladas por inflorescência. Essa plasticidade também é observada em *B.rubescens*, *B.parinarioides* e *B.melanopotamicum* (Berg, 1972).

Em *B.gaudichaudii*, indivíduos de *H. fiebrigi* desenvolvem os primeiros estágios ninfais sobre uma única inflorescência, obtendo recursos para a desenvolvimento em adulto. Quando os tripes se tornam adultos, as flores estaminadas estão iniciando a antese e esses passam a circular e se alimentar de pólen em diversas inflorescências.

A presença predominante de ninfas de *H. fiebrigi* durante o início da floração, combinado com o surgimento de frutos apenas após o aparecimento massivo de adultos, sugere que durante o início da floração, inflorescências sirvam para nutrir e aumentar a população de polinizadores, e esses, por suas vez, quando em abundância, polinizam efetivamente *B. gaudichaudii*.

Devido ao tamanho diminuto, não ficou claro qual o recurso floral utilizado por *H. fiebrigi* durante os estágios ninfais, quando ainda não existe pólen disponível para a alimentação. Entretanto, tricomas capitados presente na superfície das inflorescências de *B. gaudichaudii* contém polissacarídeos e lipídios (Jacomassi et al., 2007) e estão concentrados

em maior proporção próximo a cavidade estigmática.

Substâncias presentes em tricomas secretores, dependendo de sua localização e da natureza do conteúdo, além de proteger os órgãos, podem atuar na atração de polinizadores e dispersores (Fahn, 2000). O papel que estas estruturas secretoras possam vir a exercer na polinização merece ser investigado com maior atenção, visto que a espécie não apresenta nectários e nem estruturas chamativas nas inflorescências (Leite, 2016).

Em *Macaranga tanarius* Airy Shaw (Euphorbiaceae), espécie também polinizada por tripes, o recurso floral fornecido não é pólen, e sim néctar secretado por tricomas na base das brácteas (Moog et al., 2002; Ishida et al., 2009).

Espécies polinizadas por tripes (Thysanoptera) tendem a ter o desenvolvimento floral sincronizados com o crescimento e desenvolvimento dos insetos. Dessa forma a planta oferece todo recurso necessário para todo o desenvolvimento do polinizador. (Varatharajan et al., 2016).

A utilização da inflorescência como local de desenvolvimento, a disparidade de densidade populacionais entre armadilhas, e o fato de ser a única espécie que visita flores estaminadas e pistiladas transportando pólen ativamente, fez com que consideremos *H. fiebrigi* o único polinizador efetivo de *B. gaudichaudii*.

O gênero *Haplothrips* é um dos mais ricos em espécies (230 espécies). *H. fiebrigi* é registrada para Argentina, Paraguai e Brasil nos estados do Rio Grande do Sul e São Paulo. (Mound, 2002; Mound e Zapater, 2003). Nada se sabe sobre a biologia dessa espécie, e, possivelmente, o nome às vezes seja usado incorretamente (Laurence Comunicação pessoal)

Espécies de *Haplothrips* tendem a exibir tigmotaxia, ou seja, gostam de se arrastar para espaços estreitos, muitas espécies de *Haplothrips* vivem nas flores de Asteraceae (Mound, 2002; Lima, 2012). Em *B. gaudichaudii* tripes se arrastam e se escondem na base e entre os pedúnculos florais, nos ápices dos ramos, entre pré-folhas e estípulas apicais, além de se abrigarem e se alimentarem na cavidade da flor estaminada por grandes períodos. Assim como em *Castilla*, não é evidente o que atrai o polinizador à flor pistilada. Aparentemente em *B. gaudichaudii*, tripes visitam flores pistiladas ao acaso, enquanto circulam por todas as inflorescências do ramo em busca de grãos de pólen.

Com esse registro, *B. gaudichaudii* passa a ser o terceiro caso de polinização por tripes em Moraceae, juntamente com *Antiaropsis decipiens* e *Castilla elastica*, ambas pertencentes a tribo Castilleae.

A semelhança entre as estruturas florais entre as espécies do gênero *Brosimum* nos faz suspeitar que outras espécies possam também ser polinizadas por tripes, e que essas relações possam explicar parte da evolução da morfologia floral e os sistemas reprodutivos observados no gênero.

Algumas características em espécies de Moraceae, como, por exemplo, inflorescências de tamanho médio e pouco atraente, sem néctar, grãos de pólen pequenos e a estrutura floral compacta e globosa, são síndromes encontradas em espécies polinizadas por tripes (Kirk, 1997).

B. gaudichaudii foi considerado auto incompatível, o que poderia explicar a baixa formação de frutos, já que tripes são considerados péssimos voadores e polinizadores não muito eficientes (Monteiro e Mound, 2012). Contudo, o sucesso reprodutivo foi baixo mesmo no tratamento manual de polinização cruzada, o que indica que outros fatores também podem estar associados a baixa formação de frutos.

Devido ao seu pequeno tamanho e fraca capacidade de voar, além de falta de órgão especializado para transportar pólen, tripes não são considerados polinizadores eficientes (Thien et al., 2000). Essa realidade, somado a auto-incompatibilidade observada em *B. gaudichaudii*, podem ser as causas para o baixo sucesso reprodutivo da espécie.

Além disso, falhas na polinização podem ocorrer em todas as etapas do processo de dispersão. O risco de falha está associado ao pólen, quando é entregue muito cedo ou tardiamente ao estigma, ou de baixa qualidade, associadas à polinizadores, quando são muito escassos ou inconstantes, ou ainda, associadas às plantas quando são especializadas ou seletivas demais (Wilcock e Neiland, 2002). Nossos resultados, combinados à análise anatômica do desenvolvimento do tubo polínico, pode revelar quais são as causas da falha na polinização em *B. gaudichaudii*.

2.5 CONCLUSÕES

B. gaudichaudii é uma espécie monoica protogínica. A duração média da inflorescência em antese é de 25 dias; os 12 primeiros dias são destinados a antese da flor pistilada e o restante para a abertura das flores estaminadas.

A floração de *B. gaudichaudii* ocorreu entre os meses de junho e janeiro no estado de São Paulo, com maior intensidade entre os meses de setembro e outubro. A formação de frutos só foi observada a partir do mês de setembro com maior atividade no mês de outubro

e novembro.

Haplothrips fiebrigi é o único polinizador de *B. gaudichaudii*. *H. fiebrigi* deposita seus ovos sobre as inflorescências jovens, onde se desenvolvem até a fase adulta, e passam a visitar ativamente flores estaminadas e pistiladas à procura de grãos de pólen. Nos ápices dos ramos adultos se encontram e copulam, e voltam a depositar seus ovos, reiniciando um novo ciclo reprodutivo.

Não foi possível determinar o motivo do baixo sucesso reprodutivo de *B. gaudichaudii*. Uma análise específica do sistema de incompatibilidade pertencente à espécie pode fornecer evidências das causas da baixa produção de frutos.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina (UEL) ao biólogo Ricardo Vinicius Zandonadi pelo auxílio em trabalho de campo, ao especialista em sistemática de Thysanoptera Laurence A. Mound pela identificação dos espécimes e a todos os funcionários da Estação Ecológica de Assis. Esse trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

26 LITERATURA CITADA

Anstett, M. 1997. Figs and fig pollinators: evolutionary conflicts in a coevolved mutualism. *Trends in Ecology & Evolution* 12(3): 94–99.

Berg, C. C. 1972. *Olmedieae and Brosimeae. Flora Neotropica*. Hafner Publishing Company: New York.

Berg, C. C. 1989. Classification and distribution of *Ficus*. *Experientia* 45(7): 605–611.

Berg, C. C. 2001. *Morae, Artocarpae and Dorstenia (Moraceae): with introductions to the family and Ficus and with additions and corrections*. Flora Neotropica. New York Botanical Garden, New York.

Bronstein, J. L., and McKey, D. 1989. The fig/pollinator mutualism: A model system for comparative biology. *Experientia* 45(7): 601–604.

Cardoso, J. C. F., Viana, M. L., Matias, R., et al. 2018. Towards a unified terminology for

angiosperm reproductive systems. *Acta Botanica Brasilica* 32(3): 329–348.

Cook, J. M., and Rasplus, J. Y. 2003. Mutualists with attitude: coevolving fig wasps and figs. *Trends in Ecology & Evolution* 18(5): 241–248.

Cruaud, A., Rønsted, N., Chantarasuwan, B., Chou, L. S., Clement, W. L., Couloux, A., and Savolainen, V. 2012. An Extreme Case of Plant–Insect Codiversification: Figs and Fig-Pollinating Wasps. *Systematic Biology* 61(6): 1029–1047.

Dafni, A. 1992. *Pollination Ecology - A Practical Approach*. Oxford: University Press.

De Faria, R. A. P. G., Coelho, M. F. B., Albuquerque, M. C. F., and Azevedo, R. A. B. 2015. Fenologia de *Brosimum gaudichaudii* Trécul (Moraceae) no cerrado de Mato Grosso. *Ciência Florestal* 25(1): 67-75.

Durigan, G. 2010. *Plano de manejo da Estação Ecológica de Assis*. São Paulo: Instituto Florestal, 172p.

Fahn, A. 2000. Structure and function of secretory cells. *Advances in Botanical Research* 31: 37–75.

Fournier, L. A. 1974. Un método cuantitativo para la medición de características fenológicas en árboles. *Turrialba* 24: 422-423.

Ishida, C., Kono, M., and Sakai, S. 2009. A new pollination system: brood-site pollination by flower bugs in *Macaranga* (Euphorbiaceae). *Annals of Botany* 103(1): 39–44.

Jacomassi, E., Moscheta, I. S., Machado, S. R. 2016. Morfoanatomia e histoquímica de *Brosimum gaudichaudii* Trécul (Moraceae). *Acta Botanica Brasilica* 21(3): 575-597.

Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellogg, E. A., Stevens, P. F., and Donoghue, M.J. 2009. *Sistemática Vegetal: Um Enfoque Filogenético*. 3ª Edição. Porto Alegre: Artmed.

Kirk, W. D. (1997) Feeding. In: Lewis T. ed. *Thrips as crop pests*. CAB International: Oxon, 65-118.

Lima, E. F. B. 2012. *Tripes (Insecta: Thysanoptera) associados a espécies de Fabaceae no meio-norte do Brasil*. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, Brasil.

Leite, V. G. 2006. Leite, 2016. *Desenvolvimento da flor e da inflorescência em espécies de Moraceae*. Ph.D. Thesis, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil.

- Lloyd, D. G. 1976. The transmission of genes via pollen and ovules in gynodioecious angiosperms. *Theoretical Population Biology* 9(3): 299–316.
- Monteiro, R. C., and Mound, L. A. 2012. Thysanoptera Haliday, 1836. in: Rafael JA; Melo GA R, Carvalho CJB, Casari SA; Constantino R. [eds.], *Insetos do Brasil: diversidade e taxonomia*. Ribeirão Preto: Brasil, 407-422.
- Moog, U., Fiala, B., Federle, W., Maschwitz, U. 2002. Thrips pollination of the dioecious ant plant *Macaranga hullettii* (euphorbiaceae) in southeast Asia. *American Journal of Botany* 89(1): 50–59.
- Mound, L. A. 2002. Thysanoptera biodiversity in the Neotropics. *Revista de Biología Tropical*. 50: 477-484.
- Mound, L. A., and Zapater, M. C. 2003. South American *Haplothrips* Species (Thysanoptera: Phlaeothripidae), with a new species of biological control interest to Australia against weedy *Heliotropium amplexicaule* (Boraginaceae). *Neotropical Entomology* 32(3) 437-442.
- Ribeiro, J. E. L. S., and Pederneiras, L. C. *Brosimum* in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB10107>>. Acesso em: 20 Fev. 2020
- Rohwer, J. G., 1993. Moraceae. In Kubitzki K., Rohwer J. G, and Bittrich V., [eds.] *The Families and Genera of Vascular Plants*. Springer- Verlag: Berlin, 438–453.
- Sakai, A. K., and Weller, S. G. 1999. Gender and sexual Dimorphism in Flowering Plants: A review of terminology, Biogeographic Patterns, Ecological Correlates, and Phylogenetic Approaches. In Geber, M.A., Dawson, T.E., and Delph, L.F., [orgs.] *Gender and Sexual Dimorphism in Flowering Plants*. Springer-Verlag: Heidelberg, 1-31.
- Sakai, S. M., Kato, H., Nagamasu, H. 2000. *Artocarpus* (Moraceae)-gall midge pollination mutualism mediated by a male-flower parasitic fungus. *American Journal of Botany* 87: 440–445.
- Sakai, S. 2001. Thrips pollination of androdioecious *Castilla elastica* (Moraceae) in a seasonal tropical forest. *American Journal of Botany* 88(9): 1527–1534.
- Silva, W. S. 2007. *Sistemática filogenética dos gêneros neotropicais da tribo Dorstenieae Dumort. Brosimum Sw, Helianthostylis Baillon e Trymatococcus Poepp. & Endl. (MORACEAE)*. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Amazonas, Brasil.
- Thien, L. B., Azuma, S. and Kawano, S. 2000. New perspectives on the pollination biology of basal angiosperms. *International Journal of Plant Sciences* 161: 225-235.

Varatharajan, R., Maisnam, S., Shimray, C. V., and Rachana, R. R. 2016. Pollination potential of Thrips (Insecta: Thysanoptera) – na overview. *Zoo's print* 21(4): 6-12.

Weiblen, G. D., and Bush, G. L. 2002. Speciation in fig pollinators and parasites. *Molecular Ecology* 11(8): 1573–1578.

Wiens, D., Calvin, C. L., Wilson, C. A., Davern, C. I., Frank, D., and Seavey, S.R. 1987. Reproductive success, spontaneous embryo abortion, and genetic load in flowering plants. *Oecologia* 71(4): 501–509.

Wilcock, C. C., Neiland, M. R. M. 2002. Pollination failure in plants: why it happens and when it matters. *Trends in Plant Science* 7: 270-277.

Zerega, N. J. C, Mound, L. A., Weiblen, G. D. 2004. Pollination in the New Guinea Endemic *Antiaropsis decipiens* (Moraceae) Is Mediated by a New Species of Thrips, *Thrips antiaropsidis* sp. nov. (Thysanoptera: Thripidae). *International Journal of Plant Sciences* 165(6): 1017–1026.

APÊNDICE I - Relação de material utilizado na análise filogenética. Código em negrito indicam número de registro de sequências obtidas da base de dados do GenBank.

Espécie	Material testemunho	Herbário	Local de coleta	Segmentos
<i>Dorstenia hirta</i> Desv.	J. M. P. Molina, 395	FUEL	PR	<i>trnL</i> -F; ETS
<i>Dorstenia tenuis</i> Bonpl. ex Bureau	J. M. P. Molina, 396	FUEL	PR	<i>trnL</i> -F; ETS; <i>rcbL</i>
<i>Brosimum alicastrum</i> Sw.	J. S. Delay, s.n.	FUEL	México	<i>trnL</i> -F; ETS
<i>Brosimum acutifolium</i> subsp. <i>obovatum</i> (Ducke) C.C.Berg	C. T. Pedrollo, s.n.	FUEL	AM	<i>trnL</i> -F
<i>Brosimum lactescens</i> (S.Moore) C.C.Berg	J. M. P. Molina, 214	FUEL	AM	<i>trnL</i> -F; ETS; <i>rcbL</i>
<i>Brosimum guianense</i> (Aubl.) Huber ex Ducke	J. M. P. Molina, 206	FUEL	AM	<i>trnL</i> -F; ETS; <i>rcbL</i>
<i>Brosimum gaudichaudii</i> Trécul	J. M. P. Molina, s.n.	FUEL	SP	<i>trnL</i> -F; ETS; <i>rcbL</i>
<i>Brosimum glaziovii</i> Taub.	G. Souza, 1816	FUEL	RJ	<i>trnL</i> -F; ETS; <i>rcbL</i>
<i>Brosimum rubescens</i> Taub.	J. M. P. Molina, 225	FUEL	AM	<i>trnL</i> -F; ETS; <i>rcbL</i>
<i>Brosimum melanopotamicum</i> C.C.Berg	J. M. P. Molina, 249	FUEL	AM	<i>trnL</i> -F; ETS; <i>rcbL</i>
<i>Brosimum utile</i> (Kunth) Oken	J. M. P. Molina, 235	FUEL	AM	<i>trnL</i> -F; ETS; <i>rcbL</i>
<i>Brosimum potabile</i> Ducke	J. M. P. Molina, 250	FUEL	AM	<i>trnL</i> -F; ETS
<i>Brosimum parinarioides</i> subsp. <i>parinarioides</i> Ducke	J. M. P. Molina, 223	FUEL	AM	<i>trnL</i> -F; ETS
<i>Brosimum parinarioides</i> subsp. <i>amplicoma</i> (Ducke) C.C.Berg	J. M. P. Molina, 244	FUEL	AM	<i>trnL</i> -F; ETS
<i>Helianthostylis sprucei</i> Baill.	J. M. P. Molina, 245	FUEL	AM	<i>trnL</i> -F
<i>Helianthostylis steyermarkii</i> C.C.Berg	J. Stropp, 119	INPA	AM	<i>trnL</i> -F; ETS; <i>rcbL</i>
<i>Trymatococcus amazonicus</i> Poepp. & Endl.	J. M. P. Molina, 220	FUEL	AM	<i>trnL</i> -F; ETS; <i>rcbL</i> <i>trnL</i> -F (MK79769); <i>rcbL</i> (JQ625978)
<i>Trymatococcus oligandrus</i> (Benoist) Lanj.				

APÊNDICE II - Sistemas sexuais de *Brosimum*, *Helianthostylis* e *Trymatococcus*

Gênero	Espécie/subespécie	Sistema sexual (literatura)	Sistema sexual (proposto)
<i>Brosimum</i> Sw.	<i>Brosimum acutifolium</i> subsp. <i>acutifolium</i> Huber	Dioica	Dioica
	<i>Brosimum acutifolium</i> subsp. <i>obovatum</i> (Ducke) C.C.Berg	Dioica	Dioica
	<i>Brosimum alicastrum</i> subsp. <i>alicastrum</i> Sw.	Dioica	Dioica
	<i>Brosimum alicastrum</i> subsp. <i>bolivarense</i> (Pittier) C.C.Berg	Dioica	Dioica
	<i>Brosimum costaricanum</i> Liebm.	Dioica	Dioica
	<i>Brosimum gaudichaudii</i> Trécul	Monoica	Monoica
	<i>Brosimum glaucum</i> Taub.	Monoica (?)	Monoica
	<i>Brosimum glaziovii</i> Taub.	Dioica	Monoica
	<i>Brosimum guianense</i> (Aubl.) Huber ex Ducke	Monoica	Monoica
	<i>Brosimum lactescens</i> (S.Moore) C.C.Berg	Dioica	Dioica
	<i>Brosimum longifolium</i> Ducke	Monoica	Monoica
	<i>Brosimum melanopotamicum</i> C.C.Berg	Dioica	Monoica
	<i>Brosimum multinervium</i> C.C.Berg	Dioica	Monoica
	<i>Brosimum parinarioides</i> subsp. <i>parinarioides</i> Ducke	Monoica ou dioica	Trioica
	<i>Brosimum parinarioides</i> subsp. <i>amplicoma</i> (Ducke) C.C.Berg	Monoica	Monoica
	<i>Brosimum potabile</i> Ducke	Monoica	Monoica
	<i>Brosimum rubescens</i> Taub.	Usualmente monoica	Androdioica
	<i>Brosimum utile</i> subsp. <i>utile</i> (Kunth) Oken	Monoica raro dioica	Monoica
<i>Brosimum utile</i> subsp. <i>allenii</i> (Woodson) C.C.Berg	Monoica	Monoica	
<i>Brosimum utile</i> subsp. <i>ovatifolium</i> (Ducke) C.C.Berg	Monoica	Monoica	
<i>Trymatococcus</i> Poepp. & Endl.	<i>Trymatococcus amazonicus</i> Poepp. & Endl.	Monoica	Monoica
	<i>Trymatococcus oligandrus</i> (Benoist) Lanj.	Monoica	Monoica
<i>Helianthostylis</i> Baill.	<i>Helianthostylis sprucei</i> Baill.	Androdioica	Androdioica
	<i>Helianthostylis steyermarkii</i> C.C.Berg	Androdioica	Androdioica

APÊNDICE III - Espécimes analisados para determinação dos sistemas sexuais.

Brosimum acutifolium subsp. *acutifolium* Huber

Amazonas, Manaus, 06/1994, Nascimento, J.R. 516 (INPA 183522); 07/1995; Souza, M.A.D. de 57 (INPA 183601); 08/1981, Nascimento, J. R. s.n. (INPA 187951); 07/1968, Rodrigues, W.A. 8512 (INPA 21342); 08/1968, Rodrigues, W.A. 8519 (INPA 21360); 08/1989, Equipe Fito 3402.2072 (INPA 261520); 08/1989, Equipe Fito 3402.497 (INPA 261529); 11/1972, Rodrigues, W.A. 9208 (INPA 39717); 01/1977, Nascimento, J.R. 275 (INPA 65716); São Gabriel da Cachoeira, 11/1987, Lima, H .C. 3235 (INPA 181608); 11/1995, Nascimento, J. R. 1109.81 (INPA 174105); 05/1975, Coêlho, L.F. 15 (INPA 49896); 11/1987 Lima, H.C. de 3235 (INPA 181608); **Mato grosso**, 07/1977, Silva, M.G. da 3367 (INPA 83935); 07/1977, Silva, M.G. da 3367 (INPA 134862); 07/1977, Silva, M.G. da 3262 (INPA 134829), 07/1977, Silva, M.G. da 3258 (INPA 134827); **Rondônia**, Porto velho, 06/2012, Amaral-Santos, A. 3659 (INPA 251648); **Roraima**, Caracará, 09/2012, Perdiz, R.O. 1598 (INPA 255386).

Brosimum acutifolium subsp. *obovatum* (Ducke) C.C.Berg

Amazonas, Manaus, 10/1974, Prance, G.T. 22829 (INPA 47412); **Rondônia**, Porto Velho, 06/2010, Pereira-Silva, G. da 15564 (INPA 244864); **Porto Rico**, San Francisco, 06/1977, Meneces, E. 646 (INPA 86001).

Brosimum alicastrum subsp. *alicastrum*

Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 08/2006, Santos, O.A. dos 128 (INPA 222843); **Venezuela**, Cano Marueta, 08/1976, Lister, JRA 667 (INPA 206217).

Brosimum alicastrum subsp. *bolivarense* Sw.

Colômbia, Arsenal, 04/1966, Forero, E. 443 (INPA 76424); **Peru**, San Martín, 04/1966, Forero, E. 443 (INPA 76424).

Brosimum gaudichaudii Trécul

Mato Grosso, Cuiabá, 09/1976, Macêdo, M, 444 (INPA 75012); Chapada dos Guimarães, 10/1973, Prance, G.T. 19211 (INPA 42702); Poconé, 09/1979, Macêdo, M. 1308 (INPA 91836); 09/1976, Macêdo, M. 444 (INPA 75012); **Minas Gerais**, Uberlândia, 10/1993, Arantes, A.A. et al. 72 (FUEL 13323); **Paraná**, Sengés, 10/2007, Uhlmann, A. et al. s.n. (FUEL

43673); **Rondônia**, Boa Vista, 05/1987, Santos, J.L. dos 753a (INPA 150249); **São Paulo**, Rancharia, 09/1994, Albino, U.B. et al. s.n. (FUEL 14570).

Brosimum glaucum Taub.

Minas Gerais, Berilo, 02/2001, Tameirão Neto, E. 3196 (FUEL 33747).

Brosimum glaziovii Taub.

Rio de Janeiro, Silva Jardim, 01/1994, Lima, H.C. de 4877 (INPA 224254); **São Paulo**, Cananea, 08/1987 Melo, M.M.R.F. de 859 (INPA 218801); Monte Alegre, 04/1994, Bernacci, LC 379 (INPA 218799); São Paulo, 10/1934, Hoehne, FC s.n. (INPA 218800).

Brosimum guianense (Aubl.) Huber ex Ducke

Acre, Rio Branco, 07/1989, Arruda, R.W.F. de 12 (INPA 159147); 10/1980, Nelson, B.W. 725 (INPA 110147); **Amazonas**, Amaturá, 11/1986, Ferreira, C.A.C. 8485 (INPA 153082); Manaus, 11/1994, Nascimento, J.R. 666 (INPA 183526), 04/1987, Milliken, W. 114 (INPA 167332), 10/2001, Castilho, C.V. 84 (INPA 232378), 12/2001, Castilho, C.V. 412 (INPA 232391); 12/1963, Rodrigues, W.A. 5386 (INPA 14055); 11/1997, Sothers, C.A. 1042 (INPA 192573); **Guiana Francesa**, Cuyuni, 10/1989, Gillespie, L.J. 2252 (INPA 201782).

Brosimum lactescens (S.Moore) C.C.Berg

Acre, Tarauacá, 09/1994, Daly, D.C. 8278 (INPA 231073); **Amazonas**, 09/1976, Meneces, E 367 (INPA 86003); Nova Olinda do Norte, 09/2011 Viana, G.P. 199 (INPA 246139); **Mato Grosso**, Aripuanã, 10/1973, Prance, G.T. 18473 (INPA 41775).

Brosimum longifolium Ducke

Amazonas, Manaus, 10/1963, Rodrigues, W.A. 5503 (INPA 14176); 09/1968, Coleta: Souza, J.A. de 194 (INPA 21537); 09/1973, Berg, C.C. P18804 (INPA 42283); 08/1976 Coleta: Oliveira, A.R. de s.n. (INPA60560); Santa Isabel, 10/1987, Ferreira, C.A.C. 9337 (INPA 157528).

Brosimum melanopotamicum C.C.Berg

Amazonas, Manaus, 08/1973, Berg, C.C. 247 (INPA 147934); 10/1981, Nascimento, J.R. 1303.1089 (INPA 174122); 11/1985, Deus, J. de 1103.71.2 (INPA 174242); Equipe Fito 1202.5895 (INPA 260281); 10/2005, Silva, J.B.D. da 391 (INPA 264434).

Brosimum multinervium C.C.Berg

Amazonas, Tefé, 12/1979, Begazo, 75 (INPA 126588), **Peru**, 02/1981, Chaccha, O. 11 (INPA 111960).

Brosimum parinarioides subsp. *parinarioides* Ducke

Amazonas, Manaus, 11/2010, Ireme, M.V. 62 (INPA 240588); 11/2007, Ramos, M.P. 459 (INPA 228605); 11/2002, Castilho, C.V. 798 (INPA 232110); 10/1990, Setz, E.Z.P. 310 (INPA 190658); 10/1989, Silva, A.P. da 2303.1662.2 (INPA 175382); 09/1989, Silva, S.S. da 3304.5625.2 (INPA 202041); 02/1993, Oliveira, A.A. de 892 (INPA 196055); 09/1989 Silva, S.S. da 3304.5625.2 (INPA 175895); 07/1987, Arnaldo s/n (INPA 148319); 08/1969, Coêlho D.F. s/n (INPA 27617); 1972, Monteiro, O.P. 72-250 (INPA 37323); 10/1969, Souza, J.A. de 235 (INPA 23865); 07/1963, Rodrigues, W.A. 5398 (INPA 14067); 09/1976, Mota, C.D.A. da 607 (INPA 66476); 11/1997, Assunção, P.A.C.L. 721 (INPA 191463); 11/1993, Assunção, PA CL 93 (INPA 183500); 09/1997, Souza, M.A.D. de 418 (INPA 191478); 11/1997, Costa, M.A.S. 792 (INPA 191467); 12/1981, Nascimento, J.R. 3392 (INPA 174158); 10/1989, Setz, E.Z.P. s.n. (INPA 198126); 03/1984, Mars, L. 3304.3414 (INPA 261454); Equipe Fito 3209.1566 (INPA 261375); 11/1981, Nascimento, J.R. 1302.2873 (INPA 174146); 11/2002, Castilho, C.V. 786 (INPA 232109); Presidente figueredo, 09/2007, Carvalho-Sobrinho, J.G. de 1709 (INPA 226746); São sebastião do Uatumã, 07/1987, Arnaldo s.n. (INPA 148320); **Guiana Francesa**, Monts La Fumée Saül, 11/1982, Mori, S.A. 15154 (INPA 150043).

Brosimum parinarioides subsp. *amplicomma* (Ducke) C.C.Berg

Amazonas, Manaus, 12/1981, Nascimento, J.R. 3392 (INPA 174158); 10/1990, Setz, E.Z.P. F310 (INPA 165018); 11/1981, Nascimento, J.R. 1302.2873 (INPA 174146).

Brosimum potabile Ducke

Amazonas, Manaus, 07/1972, Silva, M.F. da 894 (INPA 36985); 09/1994, Assunção, P.A.C.L. 42 (INPA 183496); 10/1982, Pessoal do C.P.F. (INPA 105994); 07/1997, Assunção, P.A.C.L. 561 (INPA 191453); 10/1996, Sothers, C.A. 909 (INPA 190067); 09/1994, Ribeiro, J.E.L.S. 1417 (INPA 183545); 1963, Rodrigues, W.A. 5465 (INPA 14134).

Brosimum rubescens Taub.

Amazonas, Manaus, 09/1987, Pruski, J.F. 3228 (INPA 183531); 11/1995, Vicentini, A. 1160 (INPA 183628); 12/1997, Souza, M.A.D. de 475 (INPA 200629); 11/2001, Castilho, C.V. 239

(INPA 232398); 01/2002, Castilho, C.V. 506 (INPA 232090); 02/2010, Silva, V.G. da 144 (INPA 267852); 05/1981, Nascimento, J.R. 1386 (INPA 174124); 08/1996, Marimon, B.S. 20 (INPA 205162); 09/1994, Vicentini, A. 714 (INPA 183616); 12/1991, Oliveira, A.A. de 259 (INPA 171441); 10/1997, Assunção, P.A.C.L. 699 (INPA 191461); 11/1995, Souza, M.A.D. de 164 (INPA 183605); 10/1966, Loureiro, A.A. s.n. (INPA 16186); 09/1995, s.c. s.n. (INPA 181525).

Brosimum utile subsp. *utile* (Kunth) Oken

Amazonas, Manaus, 05/1973, Silva, MF da 1717 (INPA 38799); 12/1994, Ribeiro, J.E.L.S. 1522 (INPA 183549); 06/1994, Vicentini, A. 588 (INPA 183612); 06/1975, Rodrigues, WA 9623 (INPA 49797); 11/1994, Ribeiro, J.E.L.S. 1492 (INPA 183548); 06/1974, Rodrigues, W.A. 9387 (INPA 43581); 06/1970, Silva, M.F. da 20 (INPA 28254); 09/1971, Prance, G.T. 15031 (INPA 33247); 12/1997, Assunção, P.A.C.L. 731 (INPA 191464); 10/2001, Pereira, E. da C. 121 (INPA 232401); 06/1982, Barbosa, M. 1685 (INPA 141242), 09/1977, Nascimento, J.R. 346a (INPA 73392); 08/1998, Vicentini, A 1313 (INPA 197330); São Gabriel da Cachoeira, 11/1987, Lima, H.C. de 3309 (INPA 181681); **Mato grosso**, Aripuanã, 06/1974, Rodrigues, W.A. 9387 (INPA 43581), 10/1973, Berg, CC P18429 (INPA 41731).

Brosimum utile subsp. *ovatifolium* (Ducke) CCBerg

Amazonas, 08/1977, Mello, F.C. de 95 (INPA 73133); 09/1971, Prance, G.T. 15031 (INPA 33247); 09/1973, Prance, G.T. 17969 (INPA 41273).

Brosimum utile subsp. *allenii* (Woodson) C.C.Berg

Bolivia, Manurepi, 10/1978, Hartshorn, G.S. 2076 (INPA 86002).

Helianthostylis sprucei Baill.

Amazonas, Manaus, 10/1989, Silva, AP da 2303.2600.2 (INPA 175389); 12/1990, Setz, E.Z.P. 837 (INPA 187596); 09/2007, Carvalho-Sobrinho, J.G. de 1697 (INPA 226760); 12/1991, Oliveira, A.A. de 252 (INPA 171436); 11/1962, Rodrigues, W.A. 4837 (INPA 13370); 01/1990, Gentry, A.H. 69220 (INPA 210729); 01/2003, Castilho, C.V. 1013 (INPA 232139); 12/1965, Rodrigues, W.A. 7336 (INPA 16728); 11/1990, Freitas, M.A. da 480 (INPA 190601); 02/1992, Nee, M.H. 42472 (INPA 173370); 1997, Lemos, M.C. 167 (INPA 202382); Presidente Figueiredo, 09/2008, Sakagawa, S. 519 (INPA 226043); 10/2006, Zartman, C.E. 6158 (INPA 226006).

Helianthostylis steyermarkii C.C. Berg

Amazonas, São Gabriel da Cachoeira, 07/2007, Stropp, J. 119a (INPA 234229); São Paulo de Olivença, 11/1986, Ferreira, C.A.C. 8506 (INPA 153103); Rio Tea, 06/1976, Coêlho, L.F. 455, (INPA 60211).

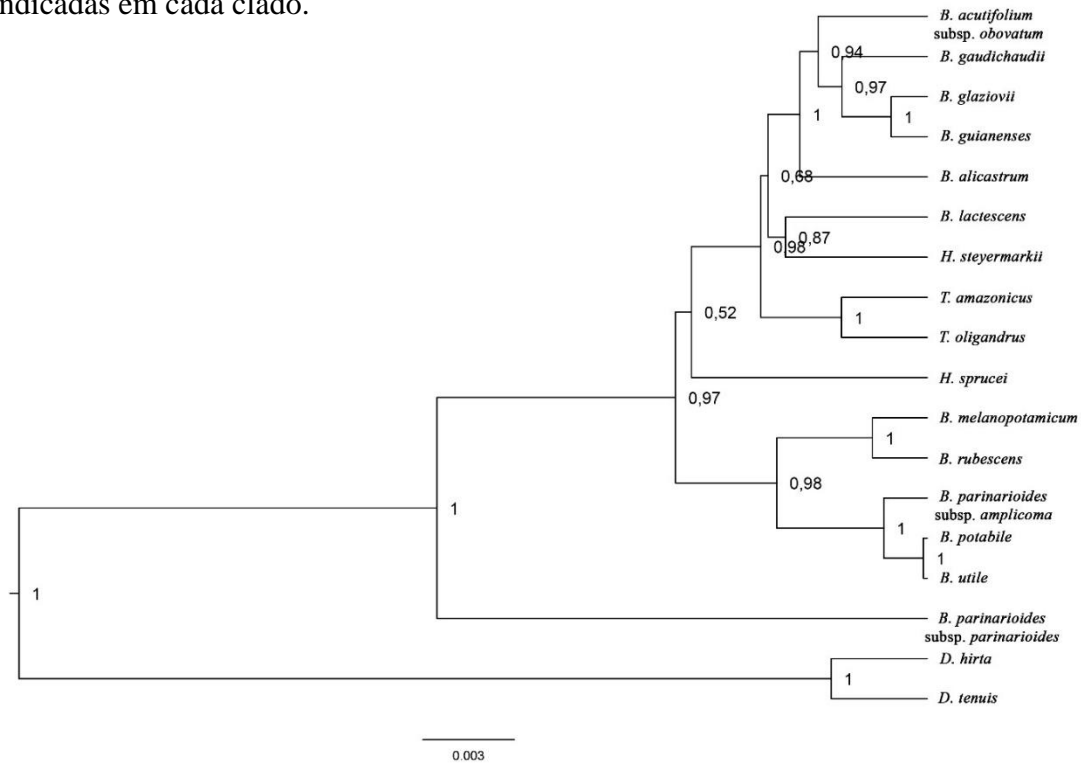
Trymatococcus amazonicus Poepp. & Endl.

Amazonas, Canutama, 08/2010 Prata, E.M.B. 209 INPA 238525, 10/1975, Coêlho, D.F. (INPA 53275), Manaus, 02/1962, Rodrigues, W.A. 4187 (INPA 10753); 01/1966, Rodrigues, W.A. 7393 (INPA 16794); 11/2011, Miranda, I.P. da A. 154 (INPA 241238); 09/1995, Souza, M.A.D. de 106 (INPA 183604); 01/1990, Freitas, M.A. de 544 (INPA 192061); 10/1989, Silva, A.P. da 1301.3346.2 (INPA 202050); 11/1991, Ferreira, C.A.C. 10595 (INPA 200282); 11/1978, Silva, M.G. da 3724 (INPA 134922); 12/1994, Assunção, P.A.C.L. 99 (INPA 183501); 06/1976, Mello, F.C. de (INPA 57923); Japurá, 04/1986, Ferreira, C.A.C. 7122 (INPA 138756); **Roraima**, 1979, Pires, J.M. 16896 (INPA 119129).

Trymatococcus oligandrus (Benoist) Lanj.

Amapá, 1956, Bastos, M 2166 (INPA 217745).

APÊNDICE IV- Filogenia combinada dos segmentos *trnL-F*, ETS de espécies arbóreas neotropicais da tribo Dorstenieae (Moraceae). As probabilidades posteriores bayesianas são indicadas em cada clado.



APÊNDICE V - Filogenia combinada dos segmentos *rbcL*, ETS de espécies arbóreas neotropicais da tribo Dorstenieae (Moraceae). As probabilidades posteriores bayesianas são indicadas em cada clado.

