



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Botânica
Programa de Pós-graduação em Botânica

Apresentação agregada das anteras do morfo brevistilo: implicações ecológicas e morfológicas no processo de fluxo de pólen em *Palicourea rigida* Kunth

Isadora Cardoso Pereira – Botânica UnB

Orientador: Prof. Dr. Hélder Nagai Consolaro

Brasília 2025



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Botânica
Programa de Pós-graduação em Botânica

Apresentação agregada das anteras do morfo brevistilo: implicações ecológicas e morfológicas no processo de fluxo de pólen em *Palicourea rigida* Kunth

Mestranda: Isadora Cardoso Pereira
Orientador: Hélder Nagai Consolaro

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Botânica, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Botânica.

BRASÍLIA-DF
Junho de 2025

ISADORA CARDOSO PEREIRA

Apresentação agregada das anteras do morfo brevistilo: implicações ecológicas e morfológicas no processo de fluxo de pólen em *Palicourea rigida* Kunth

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Botânica, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Botânica.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Felipe Wanderley Amorim
Universidade Estadual Paulista -
UNESP
Membro titular

Prof. Dr. Thiago José de Carvalho
André
Universidade de Brasília- UNB
Membro titular

Prof. Dr. Hélder Nagai Consolaro
Universidade Federal de Catalão -
UFCat
Orientador

Profa. Dra. Cássia Beatriz
Rodrigues Munhoz
Universidade de Brasília- UNB
Membro suplente

BRASÍLIA-DF
Junho de 2025

“In the study of flowers, we may trace the slow but sure steps by which nature has perfected mechanisms for the perpetuation of species.”

— Charles Darwin (paraphrased) The Different Forms of Flowers on Plants of the Same Species (1877)

AGRADECIMENTOS

Deixo aqui toda minha gratidão primeiramente a meus pais Ismenia Cardoso e Sérgio Pereira, que sempre foram o esteio da minha vida, me mostrando o valor da educação e tornando possível todo meu desenvolvimento, seja no incentivo ou no apoio para que tudo corresse da melhor forma, me proporcionando o melhor que podiam sempre. Segundamente agradeço aos outros membros da minha família que sempre apoiaram e ressaltaram a beleza da educação. Agradeço ao meu tio Maciel que foi inspiração, conselheiro e apoio, tanto para despertar o espírito do pesquisador em mim, como me recebendo em todos os momentos que precisei em sua casa, por isso, agradeço também minha tia Maria Eunice, e meus primos Felipe, Vitória e Mariana por todo apoio e parceria de vida.

Agradeço ao meu companheiro Gabriel, pelo apoio em todos os aspectos de minha vida e no decorrer desse trabalho, inclusive em campo.

Agradeço aos meus amigos e fontes de inspiração Eliete e Gilmar, que também trilharam esse caminho acadêmico, agradeço ao Gilmar pelas longas conversas e apoio.

Agradeço ao meu nobre orientador Prof Dr. Hélder Nagai Consolaro, por exercer sua função com maestria, me apoiando e mostrando o caminho de forma essencial para a conclusão deste trabalho. Agradeço por confiar em mim e revelar minha capacidade antes mesmo de eu saber ser capaz.

Agradeço aos parceiros experientes Raphael e Marco Túlio pelo auxílio em campo, nas dicas e na produção desse trabalho.

Agradeço à querida UFCAT, onde minha caminhada começou e onde pude executar os experimentos cruciais para minha pesquisa.

Agradeço à UNB que ampliou minha visão e instigou a sede por conhecimento.

Agradeço a todos do PPG-Bot, por todo conhecimento proporcionado.

Agradeço ao PROAP-Bot pelo auxílio recebido.

Este trabalho recebeu apoio financeiro do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - 305219/2022-7).

SUMÁRIO

RESUMO	6
INTRODUÇÃO	7
OBJETIVO GERAL	10
MATERIAL E MÉTODOS	11
Área de estudo e espécie estudada	11
Tridimensionalidade na hercogamia recíproca	13
Índice de inacurácia no posicionamento dos órgãos	14
Deposição de pólen no corpo dos polinizadores	16
Análises estatísticas	16
RESULTADOS	17
Tridimensionalidade na hercogamia recíproca	17
Deposição de pólen no corpo dos polinizadores	19
DISCUSSÃO	20
REFERÊNCIAS	25
VERSÃO DO CAPÍTULO EM INGLÊS	31

RESUMO

Em espécies distílicas, a hercogamia exerce um papel fundamental na promoção do fluxo legítimo de pólen. Em *Palicourea rigida* (Rubiaceae), registramos um arranjo espacial incomum dos órgãos altos, no morfo brevistilo, caracterizado pela agregação das anteras e deslocamento do estigma longistilo. Essa hercogamia recíproca tridimensional funciona como um mecanismo compensatório para a baixa reciprocidade e a deposição imprecisa de pólen frequentemente observadas entre os órgãos altos. As flores são visitadas majoritariamente por beija-flores e abelhas, apesar de ambos serem eficientes no fluxo de pólen, parecem interagir de forma distinta com a morfologia floral: beija-flores parecem promover com maior eficiência o fluxo legítimo de pólen entre os órgãos baixos, enquanto as abelhas atuam mais intensamente entre os órgãos altos, onde ocorre a hercogamia recíproca tridimensional, devido a diferenças na deposição de pólen em seus corpos. Além disso, a agregação das anteras favorece uma liberação mais volumosa de pólen, especialmente na região dorsal do corpo dos polinizadores, aumentando a chance de contato com o estigma oposto. Nossos dados mostram que os órgãos altos apresentam maior variabilidade posicional e angulação voltada à face superior da corola, enquanto os órgãos baixos são mais estáveis e precisos. Os resultados sugerem uma especialização funcional entre morfos e tipos de polinizadores, além de expandirem o conceito de hercogamia recíproca tridimensional para flores tubulares, tradicionalmente associadas apenas à reciprocidade bidimensional.

INTRODUÇÃO

Palicourea rigida Kunth (Rubiaceae) é uma espécie de Angiosperma, tipicamente distílica, comum do Cerrado brasileiro polinizada, principalmente, por beija-flores e abelhas (Machado et al. 2010; Furtado et al., 2023). Por ser distílica, cada indivíduo possui um tipo floral específico, sendo um denominado morfo brevistilo, no qual as anteras estão mais altas do que o estigma, e outro chamado longistilo em que o estigma é mais alto do que as anteras (Ganders, 1979). Em decorrência dessa arquitetura, a altura das anteras e do estigma dos diferentes morfos acabam apresentando uma correspondência, o que morfológicamente é denominado hercogamia recíproca (HR) (Hamilton, 1990). Segundo predição de Darwin (1877), a HR desempenha um papel fundamental nas taxas de polinizações cruzadas legítimas (fluxo de pólen intermorfo) por meio da deposição dos grãos de pólen dos dois morfos em regiões específicas no corpo dos polinizadores que, naturalmente, entrarão em contato com o estigma do morfo oposto.

Na maioria das espécies distílicas de Rubiaceae, os estames dos dois morfos são epipétalos e se apresentam distribuídos homogeneamente ao redor da parede interna do tubo da corola formando um círculo, sendo o pistilo localizado na região central (Anderson, 1973). Embora *P. rigida* apresente a mesma configuração floral da família, a disposição dos órgãos sexuais se diferencia das demais espécies, especialmente, no arranjo dos órgãos altos (estames brevistilos vs. pistilo longistilo). No morfo brevistilo, a porção livre dos filetes apresenta uma curvatura que faz com que todas as anteras se apresentem de forma agregada na região superior da entrada da corola. Do mesmo modo, o estilete do morfo longistilo se encontra levemente deslocado ocupando a mesma região superior da corola, o que acaba gerando uma correspondência entre os órgãos (ver detalhes nas Figuras 1A, B; 2C, D). Curiosamente, o arranjo morfológico dos órgãos baixos (estames longistilos vs. pistilo brevistilo) segue o mesmo padrão das demais espécies distílicas de Rubiaceae, porém a especificidade dos órgãos altos, provavelmente, pode gerar algum efeito diferenciado no padrão de deposição de pólen no corpo do polinizador e, possivelmente, no fluxo de pólen intermorfo. Essas características morfológicas nos levam a considerar que exista alguma forma de especialização funcional entre os morfos de *P. rigida*, como já observado em outras espécies heterostílicas (González et al., 2005; Matias et al., 2021; Nicholls, 1986; Valois-Cuesta et al., 2012).

Por vezes, a morfologia floral somada a outros fatores, tais como a alocação diferencial de recursos e a ineficiência funcional dos polinizadores, podem desequilibrar o fluxo de pólen e influenciar a especialização sexual em espécies distílicas (Freeman et al., 1997; Käfer et al., 2017; Nicholls, 1987). É bem verdade que alguns estudos sobre fluxo de pólen em espécies distílicas

demonstram que algumas populações apresentam fluxo intermorfo assimétrico (Stone et al., 1994; Lau & Bosque, 2003; García-Robledo, 2008) e outras simétrico (Lloyd & Webb, 1992), porém poucos buscam entender o real motivo do equilíbrio ou do desequilíbrio. Em determinadas espécies, observa-se que os morfos desempenham desigualmente as funções reprodutivas, de modo que o morfo brevistilo tende a desempenhar um papel mais masculino, atuando principalmente na doação de pólen, enquanto o longistilo apresenta maior eficiência na produção de frutos (Freeman et al., 1997; Käfer et al., 2017). Em *Lythrum salicaria* (Lythraceae), uma espécie tristílica, o morfo brevistilo gera frutos com baixa taxa de germinação sugerindo uma maior eficiência na função masculina, enquanto o medistilo tem mais eficiência em gerar frutos com alta taxa de germinação (Nicholls, 1987). A especialização pode ser ainda mais acentuada quando se considera o efeito do fluxo de pólen intermediado por polinizadores ineficientes. Em situações de fluxo de pólen assimétrico, com discrepâncias entre a função potencial e a função realizada dos morfos, pode ocorrer o favorecimento da especialização sexual dos morfos (Valois-Cuesta, 2012). Até o momento, nenhum desses fenômenos foram observados em *P. rigida*, uma vez que a maioria das populações é isoplética (Machado et al., 2010), o fluxo de pólen entre os morfos é simétrico (Raupp et al., 2020) e não existe diferença na função sexual dos morfos, pois ambos produzem a mesma quantidade de pólen (Silva et al., 1995) e têm taxas de frutificação e produção de sementes semelhantes (Furtado et al., 2023). Portanto, a arquitetura específica dos órgãos altos de *P. rigida*, provavelmente, desempenha um papel ainda desconhecido na dinâmica de polinização e na eficiência funcional de cada morfo para que possa justificar a sua morfologia diferenciada.

Muito embora Darwin (1877) tenha trabalhado a HR em um único plano de dimensão linear (a altura das anteras e estigmas), a teoria, de certa forma, já mencionava uma particularidade morfológica dos órgãos sexuais de *Linum grandiflorum* (Linaceae) que remetia a uma possível tridimensionalidade na reciprocidade dos órgãos. De acordo com o esperado na HR tridimensional, além da diferença na altura das anteras e estigmas, há também uma diferença na posição angular desses órgãos dentro da flor. Essa combinação de diferenças entre altura e ângulo cria uma separação espacial mais complexa, dificultando ainda mais a autofecundação e favorecendo o fluxo de pólen legítimo (Armbruster et al., 2006; Rech et al., 2020; Turketti et al., 2012). A tridimensionalidade é, normalmente, atribuída a espécies com corola aberta, pois a bidimensionalidade por si só seria insuficiente para garantir a polinização cruzada, então desnecessária em espécies com flores tubulares. No estudo conduzido com *Turnera subulata* (Turneraceae) (Rech et al., 2020), buscou-se investigar o efeito da tridimensionalidade na deposição de pólen no corpo do visitante e o seu efeito na polinização legítima, de modo que demonstrou que

a deposição de pólen brevistilo foi maior no abdômen e do longistilo na cabeça de abelhas visitantes, bem como confirmou que a tridimensionalidade otimiza o fluxo de pólen intermorfo. De forma semelhante para *Linum suffruticosum* (Armbruster et al., 2006), foi demonstrado que a maior reciprocidade entre as anteras e os estigmas ocorre em relação ao posicionamento tridimensional representado pelo grau de rotação de estiletos e filetes e não na altura. O trabalho ainda demonstrou que a tridimensionalidade promoveu uma deposição setorizada no corpo dos polinizadores, com as anteras brevistilas depositando no dorso dos polinizadores e as longistilas no ventre, além de que contribuiu para uma maior frequência de polinização legítima. Para Oxalidaceae, a tridimensionalidade foi sugerida pela primeira vez em duas espécies tristílicas de *Oxalis* (Turketti et al., 2012). De qualquer modo, os trabalhos tentaram descrever e demonstrar a funcionalidade da hercogamia recíproca tridimensional (HR 3D) na reprodução de plantas distílicas, a partir de uma deposição de pólen mais específica no corpo dos polinizadores.

A tridimensionalidade em Rubiaceae nunca foi investigada, possivelmente, devido ser um grupo com corola tubular e pela apresentação agregada das anteras ser uma condição rara, sendo observada apenas em *Psychotria nitidula* (Furtado, 2015), *Palicourea deflexa* (Matias et al., 2016) e *P. rigida*. É sabido que em espécies de *Palicourea*, a morfologia das flores e o comportamento dos polinizadores, tais como beija-flores e abelhas, desempenham papéis específicos no processo de polinização (Consolaro et al., 2009; Machado et al., 2010; Raupp et al., 2020; Furtado et al., 2021, 2023). Estudos de fluxo de pólen em espécies de *Palicourea* demonstraram que a interação entre diferentes grupos de polinizadores e os morfos florais podem gerar variações significativas na transferência de pólen (Fishbein & Venable, 1996; Wilmer et al., 2017; Roquer-Beni et al., 2022), influenciando não só a formação de frutos, mas também a adaptação da planta a seu ambiente e a pressão seletiva exercida pelos polinizadores (Fenster et al., 2004; Waser et al., 1993). Em *P. lasiorrachis*, a partir da polinização por beija-flor, foi possível perceber que quando as flores brevistilas são utilizadas como doadoras de pólen, o polinizador levou poucos grãos de pólen em comparação a longistila, no entanto os grãos de pólen foram dispersos de maneira mais uniforme em estigmas longistilos (Feinsinger et al., 1987). Estudos mais amplos sobre fusão estaminal sugerem que a apresentação agregada das anteras tende a favorecer a precisão na deposição de pólen no corpo dos polinizadores, de modo a aumentar a eficiência da polinização cruzada e o sucesso reprodutivo (Ren, 2008). Para *P. rigida*, foi encontrado que uma população visitada, majoritariamente, por beija-flores apresentou altas taxas de transferência de pólen legítima, tanto para brevistilo quanto para longistilo (Furtado et al., 2021), em contraste com *P. padifolia* e *P. demissa*, nas quais os beija-flores tendem a depositar mais pólen legítimo nos estigmas brevistilo do

que nos longistilo. Ademais, foi demonstrado que populações de *P. rigida* visitadas por beija-flores recebem mais pólen legítimo do que populações visitadas por beija-flores e abelhas (Furtado et al., 2023)

A influência de aspectos tridimensionais da hercogamia recíproca e a relação com os polinizadores na eficiência do fluxo de pólen ainda são pouco compreendidas, especialmente em Rubiaceae, uma família com flores de corola tubular. Considerando a diversidade de interações entre flores e polinizadores e as variações na deposição de pólen, torna-se essencial investigar como essas características estruturais da biologia floral podem modular a eficiência da polinização e a reprodução das plantas. Sendo assim, este estudo buscou aprofundar o entendimento sobre a hercogamia recíproca tridimensional, o papel da apresentação agregada das anteras e toda a sua influência sobre a relação com os polinizadores em *P. rigida*, contribuindo assim, para o conhecimento sobre os mecanismos que mantêm a distília e promovem a reprodução cruzada em espécies distílicas.

OBJETIVO GERAL

Muito embora a tridimensionalidade dos órgãos sexuais possa ocorrer na arquitetura de qualquer flor, uma vez que é esperado que haja uma certa distância vertical e horizontal entre o posicionamento de anteras e estigmas, a HR 3D é, praticamente, ignorada nos estudos de reciprocidade, independentemente se a espécie seja distílica com corola tubular ou aberta. Apesar de *P. rigida* ser uma espécie bem estudada e comum no Cerrado brasileiro (Machado et al., 2010; Raupp et al., 2020; Furtado et al., 2021, 2023), não existem trabalhos que destacam a peculiaridade do arranjo morfológico dos órgãos altos em relação aos baixos, tampouco estudos que tentem compreender o seu possível efeito sobre o fluxo de pólen intermorfo. Como estudos básicos de biologia reprodutiva, polinizadores e fluxo de pólen para a espécie já foram desenvolvidos (Machado et al., 2010; Raupp et al., 2020; Furtado et al., 2021, 2023), trabalhos específicos como o aqui proposto são fundamentais para auxiliar na busca de respostas mais precisas relacionadas a funcionalidade da tridimensionalidade. Portanto, o objetivo do presente estudo foi investigar o significado ecológico e evolutivo da tridimensionalidade na hercogamia recíproca de *P. rigida* verificando variações na posição horizontal e vertical das anteras e dos estigmas, e o efeito desta variação na reciprocidade dos órgãos altos e baixos, além de verificar se diferenças entre os morfos no nível de agregação das anteras e do deslocamento do estigma interferem na deposição de pólen no corpo dos beija-flores e abelhas. Algumas hipóteses vinculadas aos objetivos foram testadas: 1) A agregação das anteras na porção superior da entrada do tubo da corola nas flores brevistilas tem o

papel de depositar o pólen em maior concentração na região dorsal do corpo do visitante, enquanto a disposição das anteras do morfo longistilo em volta da parte interna no tubo da corola fazem com que o pólen seja depositado em ambas as regiões (dorso e ventre); 2) O deslocamento do estigma longistilo para a porção superior da entrada da corola acompanha o posicionamento agregado das anteras do morfo brevistilo, gerando uma maior reciprocidade entre os órgãos altos; 3) A tridimensionalidade na HR entre os órgãos altos não é um fator de desequilíbrio no fluxo de pólen intermorfo; 4) Como Furtado et al., (2021) encontraram que populações de *P. rigida* visitadas por abelhas apresentam assimetria no fluxo de pólen intermorfo, enquanto as população visitadas por beija-flores apresentam simetria, esperamos que para os beija-flores a deposição de pólen do morfo brevistilo ocorra na região dorsal e nas abelhas espalhados aleatoriamente na cabeça e probóscide.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo e espécie estudada

Foram coletados ramos florais de *P. rigida* em duas populações distribuídas em cerrado típico no município de Catalão, GO, sendo as mesmas dos estudos de Raupp et al., (2020) e Furtado et al., (2021, 2023): Fazenda Pé-do-Morro, pertencente à Universidade Federal de Catalão-UFCAT (18° 06'51.9" S e 47° 59'55.6" W) e Reserva Ecológica Pasto do Pedrinho (18°09'46" S e 47° 56'31" W). O clima da região é marcadamente sazonal, com uma estação fria e seca de maio a setembro, e outra estação quente e chuvosa de outubro a abril (Köppen, 1948). A precipitação média anual é de 1522 mm, com 88% da precipitação concentrada entre outubro e março, e a temperatura média anual é de 23°C (Vieira et al., 2012).

Palicourea rigida é uma espécie arbustiva-arvoreta de até 3,5m comum no Bioma Cerrado com flores dispostas em inflorescências terminais pedunculadas com corola tubular amarelo-laranja a amarelo com cerca de 13 mm de comprimento (Figura 2A-D). A presença dos dois morfos distílicos é uma característica comum na espécie (Figura 2C, D), sendo a distília estabelecida em suas populações (Machado et al., 2010; Raupp et al., 2020; Furtado et al., 2021; Furtado et al., 2023; Rodrigues et al., 2022). Os estames de ambos os morfos são epipétalos, porém os do morfo longistilo são inclusos e do brevistilo, exsertos (Figura 2D, 3A, B). Além dessa diferença, como já mencionado, as anteras do morfo brevistilo estão apresentadas de forma agregada na porção superior da corola (Figura 2D, 3B), enquanto as anteras longistilas são distribuídas de forma circular ao redor da parede interna da corola (Figura 3A). O pistilo do morfo brevistilo é integralmente incluso com os lobos estigmáticos maiores do que os do morfo longistilo (Furtado et al., 2021). O morfo longistilo apresenta o pistilo, levemente, deslocado para a face superior da entrada da corola (Figura 2C, 3A).

Estudos de biologia reprodutiva e sistema de polinização de *P. rigida* encontraram que as populações até então estudadas possuem uma razão equilibrada dos morfos (isopleitia), que são autoincompatíveis, que possuem uma maior reciprocidade na altura dos órgãos baixos (antera longistila vs. estigma brevistilo), que o morfo brevistilo recebe maior carga de pólen legítimo, que os beija-flores são polinizadores mais eficientes no fluxo de pólen intermorfo do que as abelhas (Figura 2E, F) e que quanto maior a reciprocidade e o tamanho do lóbulo estigmático dos morfos, maior é a carga de pólen legítimo (Raupp et al., 2020; Furtado et al., 2021; Furtado et al., 2023).

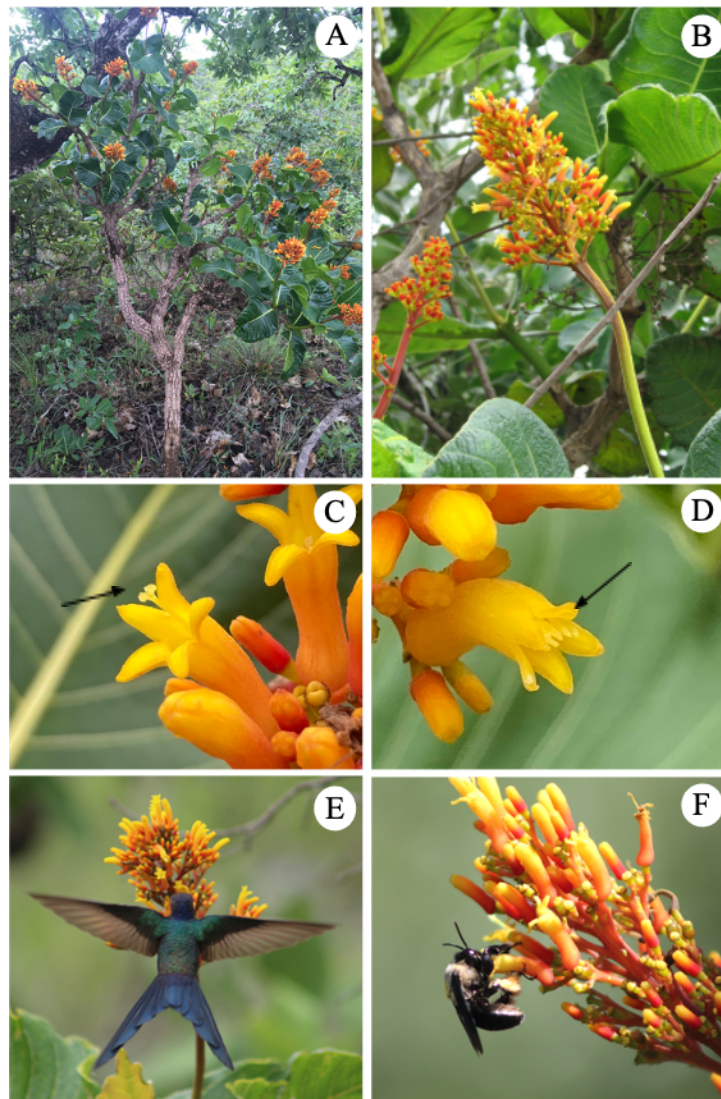


Figura 2. Aspectos gerais de *Palicourea rigida* (Rubiaceae). A: Hábito arbustiva-arvoreta com cerca de 2,5m. B: Destaque da inflorescência e coloração das flores. C: Morfo longistilo com o estilete levemente deslocado para a porção superior da entrada da corola (seta preta). D: Morfo brevistilo com destaque para os estames exsertos e disposição agregada das anteras na entrada da corola (seta preta). E: Beija-flor *Eupetomena macroura* durante visita às flores. F: Abelha *Epicharis flava* durante visita às flores.

Experimentos

Os principais dados do presente estudo foram coletados em laboratório a partir de testes simulatórios de visitas nas flores de *P. rigida*. Os ramos com botões florais foram coletados em campo, imediatamente acondicionados em um recipiente com água e levados ao laboratório da UFCAT. Os ramos foram alocados próximos a um ambiente iluminado e à medida que as flores abriam, as simulações e fotografias foram sendo realizadas (Figura 1A, B).

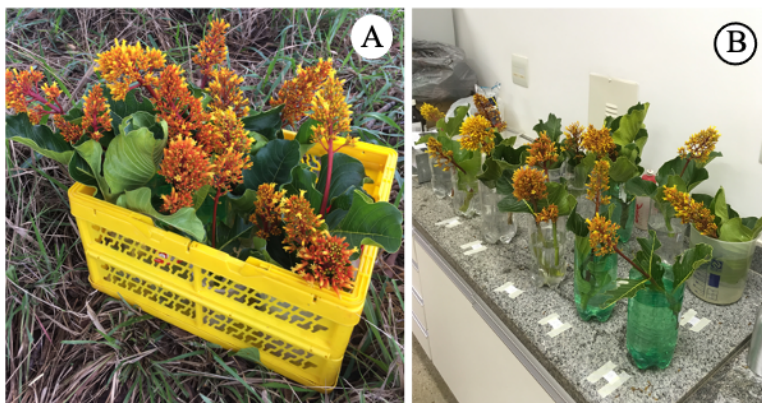


Figura 1. Ramos florais de *Palicourea rigida* (Rubiaceae) coletados na Fazenda Pé-do-Morro, Catalão, GO. A: Ramos coletados e armazenados em recipientes com água para serem levados ao Laboratório de Biologia Reprodutiva das Angiospermas da UFCAT. B: Ramos dos dois morfos florais acondicionados em recipientes individualizados com água para serem realizadas as simulações de visitas e fotografias para posteriores medições das flores em laboratório.

A coleta e a condução dos experimentos em laboratório foram realizadas em 2023 e 2025 entre o período de outubro a janeiro, meses de floração das populações de *P. rigida* na região. Particularmente em 2024, os baixos índices pluviométricos associados às altas temperaturas fizeram com que a floração das populações fosse atípica, de modo que as flores murcharam rapidamente e a floração ocorreu em menor intensidade.

Tridimensionalidade na hercogamia recíproca

A hercogamia recíproca, especificamente, no plano bidimensional (altura dos órgãos sexuais) já foi realizada e analisada nas mesmas populações por Raupp et al., (2020), de modo que foi encontrado que os órgãos baixos (antera longistila vs. estigma brevistilo) são mais recíprocos do que os órgãos altos. Para o presente estudo, as medidas tomadas foram restritas a averiguação da tridimensionalidade, sendo elas: 1) distância vertical da região central da entrada da corola até a localização onde se encontra cada órgão sexual – anteras e estigma (Figura 3A, B); 2) distância horizontal da região central da entrada da corola até a localização onde se encontra o órgão

(Figura 3C, D); 3) Afastamento dos órgãos do centro da entrada da corola (Figura 3E, F); 4) angulação dos órgãos dentro de um espectro de 0-360° (Figura 3G, H). As mensurações foram tomadas utilizando o Software ImageJ a partir de fotos da visão frontal da entrada da corola (30 flores por morfo, sendo uma flor por indivíduo) (Figura 3A-H). Para a distância horizontal, as medidas à direita do centro foram consideradas valores positivos e a esquerda, negativos. Da mesma forma, para distância vertical, acima do centro os valores foram positivos e abaixo, negativos. Os dados de distância horizontal e vertical foram usados para calcular a inacurácia no posicionamento dos órgãos sexuais (ver abaixo). As medidas de angulação e afastamento dos órgãos do centro da flor foram utilizadas apenas para inspeção visual, sendo gerado um gráfico de análise circular para conferência da dispersão dos órgãos na flor, especialmente devido à unidade de medida da angulação (graus) ser diferente das outras (milímetros). Todas as mensurações foram realizadas para todas as anteras da flor (5) e, especificamente, para o estigma foram tomados três pontos (esquerda, centro e direita) como forma de representar toda a superfície estigmática.

Índice de inacurácia no posicionamento dos órgãos

A medida de inacurácia adaptativa de Armbruster et al., (2017) foi utilizada, pois fornece uma escala quantitativa que reflete o impacto funcional da morfologia floral na eficiência da polinização e, conseqüentemente, na aptidão reprodutiva. O cálculo foi feito pela seguinte fórmula, para os órgãos altos [Inacurácia dos órgãos altos = (média anteras brevistilas + média estigmas longistilas)² + variância anteras brevistila + variância estigmas longistilas] e baixos [Inacurácia dos órgãos baixos = (média anteras longistilas + média estigmas brevistilas)² + variância anteras longistilas + variância estigmas brevistilas] (Armbruster et al., 2017). Como pode ser observado nas fórmulas acima, o índice de inacurácia é decomposto em viés maladaptativo (média anteras + média estigmas)² e imprecisão (variância anteras + variância estigmas). Esses dois componentes são somados para obter o valor de inacurácia de cada tipo de órgão (altos e baixos). Os valores de viés maladaptativo, de imprecisão e de inacurácia foram obtidos utilizando as medidas de distância horizontal e vertical separadamente. Posteriormente, o valor de inacurácia da distância horizontal foi somado com o valor de inacurácia da distância vertical, dentro da mesma combinação de órgãos sexuais (órgãos altos ou baixos), para obter a inacurácia total para cada nível de altura (Braga et al., 2022). Quanto mais próximo de zero for o valor obtido, menor será a inacurácia e maior será a reciprocidade dos órgãos sexuais (Armbruster et al., 2017).

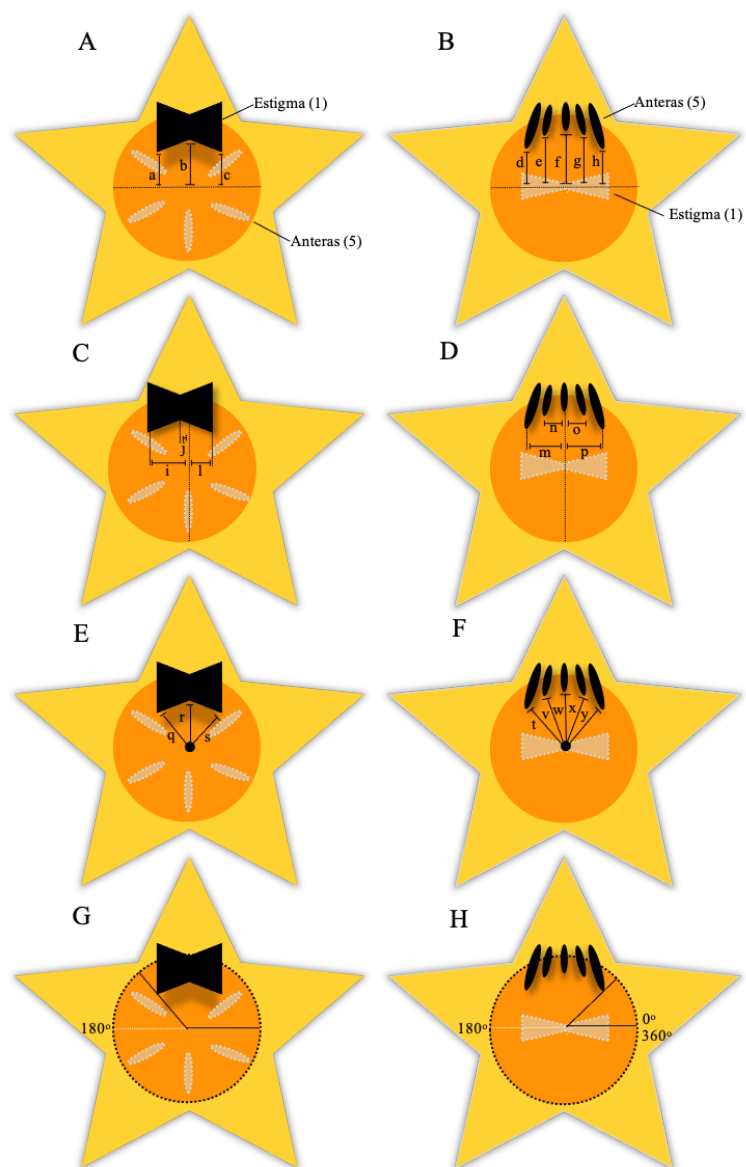


Figura 3. Arquitetura floral do morfo longistilo (A, C, E e G) e brevistilo (B, D, F e H) de *Palicourea rigida* (Rubiaceae). Os órgãos altos estão em preto para destacar que se encontram em primeiro plano, enquanto os órgãos baixos em cinza, em segundo plano. A: Esquema para medir a distância vertical do estigma da região equatorial da abertura da corola: três pontos de medição, correspondendo ao centro do estigma e as suas extremidades (a-c). B: Esquema para medir a distância vertical de cada antera da região equatorial da abertura da corola (d-h). C: Esquema para medir a distância horizontal das partes do estigma em relação ao centro longitudinal da abertura da corola (i-l). D: Esquema para medir a distância horizontal das anteras em relação ao centro longitudinal da abertura da corola (m-p). E: Esquema para medir a distância de afastamento do estigma em relação a região central da entrada da corola, considerando os três pontos de medição do estigma (q-s). F: Esquema para medir a distância de afastamento das anteras da região central da entrada da corola (q-s). G e H: Esquema para medir angulação do posicionamento das anteras e das partes do estigma em relação ao centro da corola.

Deposição de pólen no corpo dos polinizadores

A análise da deposição de grãos de pólen no bico do beija-flor e no corpo da abelha, especificamente a cabeça e probóscide, foi realizada por testes simulatórios de visitas de um exemplar do beija-flor *Eupetomena macroura* e da abelha *Epicharis flava*, espécies tidas como umas das principais polinizadoras das flores de *P. rigida* (Furtado et al., 2023). As simulações foram conduzidas por meio de exemplares taxidermizados, pois a captura e a manipulação dos beija-flores poderiam causar uma tensão muito grande ao animal e levá-lo à morte e a captura das abelhas poderia afetar o comportamento das visitas, bem como a manipulação dos espécimes poderia afetar negativamente os resultados dos grãos de pólen e causar a morte do animal. Outros trabalhos desenvolvidos pelo mesmo grupo de pesquisa realizando testes simulatórios de visitas já foram publicados, como Raupp et al., (2020) na revista Flora (<https://doi.org/10.1016/j.flora.2020.151681>) e Furtado et al., (2023) na revista American Journal of Botany (<https://doi.org/10.1002/ajb2.16194>). Os exemplares utilizados fazem parte do acervo de visitantes florais do Laboratório de Biologia Reprodutiva das Angiospermas da UFCAT. As visitas simuladas para os beija-flores foram realizadas inserindo, parcialmente, o bico no tubo floral e para as abelhas a cabeça com a probóscide estendida. Foram conduzidas 30 visitas para cada visitante em cada um dos dois morfos. Para que a profundidade de inserção do bico e da cabeça/probóscide da abelha no tubo da corola fosse o mais próximo do natural, foram realizadas observações e registros de visitas filmadas em campo (filmadora Sony Handycam HDR-CX 405). Após a realização de cada visita, os grãos de pólen foram retirados do corpo do polinizador com o auxílio de gelatina de fucsina para a montagem das lâminas levando em consideração duas regiões do corpo separadamente, dorsal e ventral. Posteriormente, o número de grãos de pólen em cada região do corpo do polinizador foi contabilizado em microscópio. Naturalmente, após cada visita o corpo do polinizador foi limpo para a realização da próxima simulação. Foram usadas flores intactas em cada simulação.

Análises estatísticas

Todas as análises deste estudo foram realizadas com o software R (versão 4.1.3; R. Core Team, 2025). Foram usados modelos lineares generalizados (GLMs) com distribuição de Poisson para comparação do número de grãos de pólen depositados pelas flores brevistilas e longistilas na região dorsal e ventral no corpo dos polinizadores. GLMs foram realizados, separadamente, para cada grupo de polinizador. A variável dependente foi o número total de pólen depositado no corpo dos polinizadores e as variáveis independentes foram os morfos florais (brevistila e longistila) e a região do corpo do polinizador (dorso e ventre). Também foi analisada a interação entre as duas variáveis independentes. Para realizar os GLMs, usamos o pacote lme4 (Bates et al., 2019) e a

função GLM. Para determinar a significância de cada variável independente (morfo floral e região do corpo) e sua interação, foi realizada uma análise de variância do tipo III usando a função Anova no pacote car (Fox et al., 2019). A função lsmeans com ajuste de Bonferroni do pacote emmeans (Lenth, 2019) foi usada como um teste post hoc.

RESULTADOS

Tridimensionalidade na hercogamia recíproca

A partir das análises realizadas, observa-se que os órgãos altos (estigma longistilo vs. antera brevistila) tendem a estar distribuídos, majoritariamente, na faixa de 0° e 180° com uma média próxima de 90° para ambos os órgãos (Figura 4A). Além da angulação, as anteras apresentam um afastamento em média de 2mm do centro e os estigmas, a aproximadamente 1,6mm (Figura 4A).

Os órgãos baixos (Figura 4B) demonstram que a distribuição dos estigmas brevistilos está mais concentrada no centro da corola, estando em sua maioria até 1,5mm afastados do centro. As anteras longistilo também estão muito concentradas no centro, com afastamento de até 0,5mm do ponto central. Nesse caso, não há concentração preferencial nas faces superior ou inferior, já que os órgãos estão distribuídos ao longo dos 360° (Figura 4B).

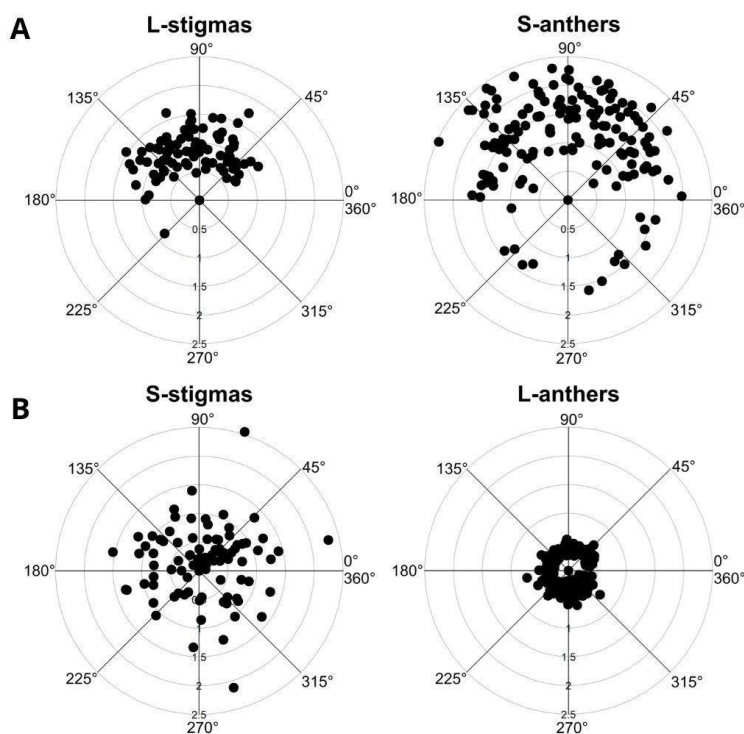


Figura 4. Gráfico circular demonstrando o posicionamento dos órgãos altos (A) (estigmas longistilo e anteras brevistilo) e baixos (B) (estigmas brevistilo e anteras longistilo). Medidas foram baseadas no afastamento do centro da corola (0 a

2.5mm) e ângulo (0° a 360°). Os pontos pretos representam os pontos onde as medidas foram tomadas: 3 pontos para cada estigma (centro e extremidades) e 1 ponto por antera, sendo 5 anteras de cada flor.

Tabela 1. Morfometria das flores de *Palicourea rigida* para o cálculo da inacurácia: média ($\pm$ variância) dos estigmas e das anteras em flores brevistilo e longistilo. Valores negativos de distância horizontal indicam que o órgão está posicionado à esquerda do centro floral, e valores positivos, à direita. Valores negativos de distância vertical indicam que o órgão está posicionado abaixo do centro floral, e valores positivos, acima.

Morfologia floral		Medidas (mm)	
Órgão sexual		Distância horizontal	Distância vertical
Brevistilo			
Anteras		0.04 (1.00)	0.98 (0.66)
Estigmas		0.08 (0.45)	0.14 (0.37)
Longistilo			
Anteras		0.02 (0.08)	0.01 (0.09)
Estigmas		-0.12 (0.33)	0.77 (0.16)

Tabela 2. A inacurácia dos órgãos altos e baixos são decompostas em viés maladaptativo² (o quadrado do desvio do traço em relação ao ótimo) e imprecisão (= variância das anteras e estigmas), por fim, esses dois componentes somados formam a inacurácia total de cada tipo de órgão.

Tipo	Distância horizontal			Distância vertical			Inacurácia total
	Viés maladaptativo	Imprecisão	Inacurácia	Viés maladaptativo	Imprecisão	Inacurácia	
Órgãos altos	0.03	1.33	1.35	0.04	0.81	0.86	2.21
Órgãos baixos	0.00	0.52	0.53	0.02	0.47	0.48	1.01

Os dados de posicionamento dos órgãos sexuais em *P. rigida* revelaram padrões distintos entre os órgãos altos e baixos, sendo as anteras brevistilas concentradas na face superior, posicionadas com média de $0,98 \pm 0,66$ mm do centro no eixo vertical e $0,04 \pm 1,00$ mm no eixo horizontal. No mesmo morfo, os estigmas se encontram mais próximos ao centro da flor, a $0,14 \pm 0,37$ mm no eixo vertical e $0,08 \pm 0,45$ mm no eixo horizontal (Tabela 1). Já nas flores longistilas, os estigmas estão localizados na face superior, com média de $0,77 \pm 0,16$ mm no eixo vertical e $-0,12 \pm 0,33$ mm no eixo horizontal, enquanto as anteras se mantêm próximas ao centro, a $0,01 \pm 0,09$ mm no eixo vertical e $0,02 \pm 0,08$ mm no eixo horizontal (Tabela 1). Em ambos os morfos, observa-se maior distanciamento vertical do que horizontal dos órgãos sexuais em relação ao centro da flor. Os órgãos altos tiveram um maior viés maladaptativo e imprecisão do que os órgãos baixos

(para afastamento horizontal e vertical), mostrando que existe um maior desvio da média entre as anteras e estigmas altos, além de maior variação no posicionamento destes órgãos (Tabela 2). Os órgãos baixos possuem a média do seu posicionamento mais próxima, com menor variação (Tabela 2). Consequentemente a inacurácia total dos órgãos altos (2,21) foi mais do que o dobro da observada nos órgãos baixos (1,01) (Tabela 2), indicando que os órgãos baixos são mais recíprocos do que os altos. As anteras do morfo brevistilo apresentaram maior variabilidade na posição horizontal (1,00 mm), seguidas pelos estigmas do morfo longistilo (0,33 mm), indicando maior dispersão lateral desses órgãos em relação ao centro da corola (Tabela 1).

Deposição de pólen no corpo dos polinizadores

Houve efeito significativo do morfo no número de grãos de pólen depositado no bico do beija-flor (Tabela 3), de modo que o morfo brevistilo (média e desvio padrão: 308.3 ± 208.0) depositou mais grãos de pólen do que o longistilo (20.48 ± 23.72). A região do bico também teve um efeito significativo (Tabela 3), havendo maior deposição de pólen no dorso em comparação ao ventre (111.3 ± 126.9). A interação morfo * parte do bico foi significativa (Tabela 3), demonstrando que o padrão de deposição de pólen no corpo do beija-flor varia entre os morfos. O pólen brevistilo foi depositado, majoritariamente, na face dorsal do bico, enquanto o pólen longistilo foi depositado de forma igualitária nas faces dorsal e ventral (Figura 5A).

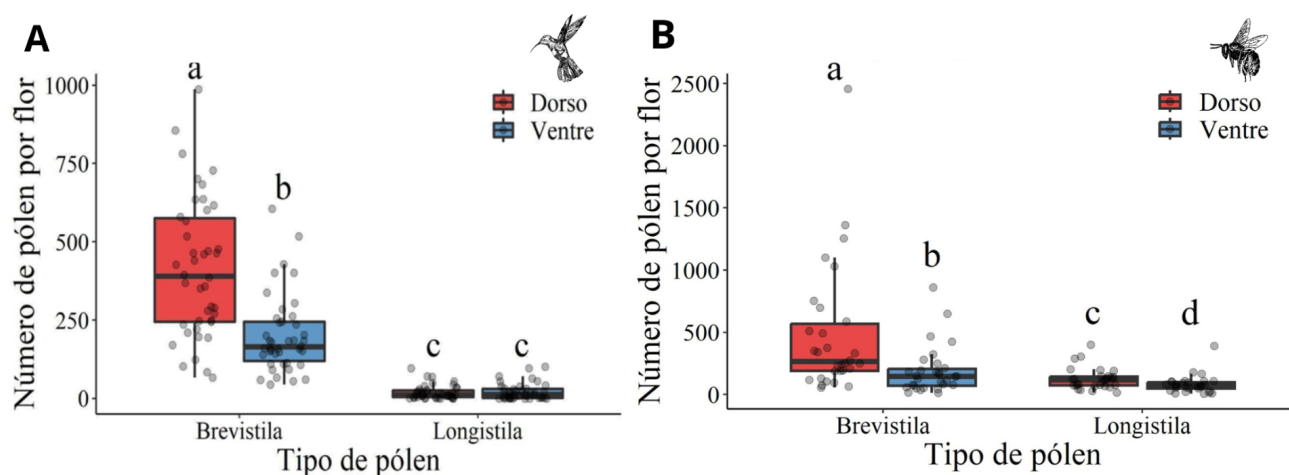


Figura 5 Quantidade de pólen dos morfos brevistilo e longistilo de *Palicourea rigida* (Rubiaceae) sobre as duas faces do bico do beija-flor *Eupetomena macroura* (A) e do corpo da abelha *Epicharis flava* após as simulações. Letras diferentes indicam quantidades significativamente diferentes de grãos de pólen depositados no beija-flor ou na abelha ($P < 0.05$).

Tabela 3. Resultados da análise de variância para testar o efeito do morfo floral (brevistilo e longistilo), faces do bico/corpo e a interação entre esses dois fatores no número de grãos de pólen de *Palicourea rigida* (Rubiaceae) depositados no corpo do beija-flor *Eupetomena macroura* e da abelha *Epicharis flava*.

Deposição de pólen no bico do beija-flor	<i>df</i>	χ^2	P
Morfo do pólen	1	18601.4	< 0.01
Parte do bico	1	3183.6	< 0.01
Parte do bico e morfo do pólen	1	257.5	< 0.01
Deposição de pólen na abelha	<i>df</i>	χ^2	P
Morfo do pólen	1	6543.0	< 0.001
Parte/região da abelha	1	3815.0	< 0.001
Parte/região da abelha e morfo do pólen	1	245.0	< 0.001

Também houve efeito significativo do morfo floral, região do corpo e da interação entre esses dois fatores no número de pólen depositado sobre o corpo das abelhas (Tabela 3). O pólen brevistilo foi encontrado em maior quantidade (544.39 ± 526.80) quando comparado com o longistilo (108.14 ± 69.42). A região do corpo com maior quantidade de pólen foi o dorso (506.08 ± 568.39) em comparação ao ventre (198.80 ± 204.64). Comparações dentro do morfo floral mostra que ambos os morfos depositam pólen em maior quantidade no dorso da abelha em comparação com o ventre (Figura 4B). No entanto, há uma maior deposição de pólen brevistila do que de longistila no dorso das abelhas, e esse padrão também ocorre no ventre, com mais pólen brevistila do que longistila (Figura 4B).

DISCUSSÃO

O presente estudo investigou uma possível tridimensionalidade na hercogamia recíproca, demonstrou a funcionalidade da apresentação agregada das anteras do morfo brevistilo e do deslocamento do estigma longistilo e compreendeu como essas características interferem no fluxo de pólen mediado pelos beija-flores e abelhas em flores de *P. rigida*. Como levantado na primeira e na segunda hipóteses, a apresentação agregada das anteras do morfo brevistilo faz com que os grãos de pólen sejam depositados de maneira distinta das anteras do morfo longistilo, sendo em maior volume na região dorsal do corpo do visitante (Figura 5). De modo complementar, o estilete longistilo se encontra em uma localização correspondente ao posicionamento das anteras do morfo

brevistilo, portanto, a agregação das anteras, conjuntamente ao deslocamento do estigma, acaba gerando uma hercogamia recíproca tridimensional entre esses órgãos, no caso os altos (Figura 4). Apesar da HR 3D ser caracterizada somente nos órgãos altos, foi constatado que não existe um desequilíbrio no fluxo de pólen intermorfo, pois ambos os órgãos, altos e baixos, recebem maior carga de pólen legítimo, apesar dos órgãos baixos receberem maior volume por serem mais recíprocos (Raupp et al., 2020). Também não foi constatado um desvio na função sexual dos morfos, visto que as populações de *P. rigida* possuem uma razão de 1:1 dos morfos (Machado et al., 2010).

A manifestação da tridimensionalidade apenas nos órgãos altos pode ser considerada uma estratégia para amenizar a menor reciprocidade e a menor precisão na deposição de pólen no corpo do polinizador e, assim, evitar a assimetria no fluxo de pólen (Armbruster et al., 2006; Sá et al., 2016; Furtado et al., 2021, 2023). É bem verdade que à medida que o beija-flor ou a abelha coleta o recurso floral na flor brevistila, no caso o néctar em *P. rigida* (Machado et al., 2010), o contato da antera com o visitante acaba espalhando o pólen ao longo da região dorsal do corpo, o mesmo ocorrendo com o estigma do morfo longistilo que acaba entrando em contato com essa faixa de pólen. Desta forma, esse reajuste hercogâmico dos órgãos altos (hercogamia recíproca tridimensional) aparece como um auxílio mecânico adicional para alcançar um fluxo de pólen intermorfo menos assimétrico. Além disso, é preciso levar em consideração que as flores de *P. rigida* podem ser visitadas tanto por beija-flores quanto por abelhas, sendo os grãos de pólen brevistilos depositados de maneiras distintas entre os visitantes, possivelmente, pela diferença no tamanho dos visitantes, pelas ornamentações corporais de cada um e/ou pelo comportamento durante as visitas.

A HR 3D é uma concepção que revela um olhar mais detalhado a respeito do posicionamento das estruturas reprodutivas das flores, não sendo considerado um novo sistema floral. Assim, é possível que muitas espécies até apresentem a tridimensionalidade dos órgãos, mas os estudos não a levam consideração. Até então, o conceito de hercogamia recíproca tridimensional foi levantado em três gêneros, *Linnum suffruticosum* (Armbruster et al., 2006), *Turnera subulata* (Rech et al., 2020) e *Oxalis* (Turketti et al., 2012), contudo o arranjo dos órgãos reprodutivos dessas espécies, diferentemente de *P. rigida*, se repete em ambos os morfos. Ademais, até o momento, a hercogamia recíproca tridimensional nunca tinha sido pautada em uma espécie de Rubiaceae ou espécie com corola tubular, pois acreditava-se que somente a reciprocidade bidimensional seria suficiente para intermediar o fluxo de pólen legítimo, além de que a limitação espacial de um tubo

estrito impossibilitaria uma terceira dimensão na organização dos órgãos (Armbruster et al., 2006). Portanto, introduzimos essa concepção morfológica para *P. rigida*, como modelo de angiosperma heterostílica com corola tubular, principalmente devido à apresentação agregada das anteras brevistilas e o deslocamento do estigma longistilo. Como diversos trabalhos com espécies distílicas, sendo muitos deles com *Palicourea* e *Psychotria*, registram um maior imprecisão na reciprocidade entre os órgãos altos (Armbruster et al., 2006; Sá et al., 2016; Raupp et al., 2020; Furtado et al., 2021), bem como uma menor precisão na deposição do pólen no corpo do polinizador pelas anteras brevistilas (Armbruster et al., 2006), sugerimos que a tridimensionalidade entre os órgãos altos seja um mecanismo compensatório para evitar a assimetria no fluxo de pólen (Armbruster et al., 2006; Sá et al., 2016; Furtado et al., 2021, 2023). Além disso, é importante dizer que além da maior reciprocidade os órgãos baixos, particularmente para espécies distílicas de Rubiaceae, os lóbulos estigmáticos das flores brevistilas costumam ser, significativamente, maiores do que os do longistilo e com uma tendência a receber uma maior carga polínica compatível (Machado et al., 2010; Furtado et al., 2021), o que justificaria ainda mais a busca por uma complementação mecânica adicional no fluxo de pólen entre os órgãos altos.

A apresentação agregada das anteras é o arranjo morfológico que constitui a tridimensionalidade dos órgãos altos, como já dito uma característica incomum em *Palicourea* e em Rubiaceae (Matias et al., 2016). O que se sabe na literatura para Rubiaceae são registros de três espécies que apresentam a mesma apresentação agregada das anteras e possíveis ilações a respeito da sua funcionalidade, tais como estudos com *Palicourea deflexa* (Matias et al., 2016), na época classificada no gênero *Psychotria*, *P. nitidula* (Furtado, 2015) e um estudo recente com a própria *Palicourea rigida* (Raupp et al., 2020). Em nenhum desses trabalhos a tridimensionalidade foi estudada, de modo que em um sistema complexo como a distília, a atuação dos polinizadores no fluxo de pólen se torna uma parte ainda mais fundamental dessa engrenagem. Estudo conduzido com a mesma população de *P. rigida* (Furtado et al., 2023) demonstrou que dentre os dois grupos principais de polinizadores há diferença na eficiência e na atuação dos polinizadores entre os morfos, sendo o beija-flor mais eficiente no fluxo de pólen legítimo entre os órgãos baixos, enquanto as abelhas no fluxo entre os órgãos altos, aqueles mais afetados pelo posicionamento tridimensional. Apesar de acreditar que a tridimensionalidade pode ser uma medida compensatória ao menor nível de reciprocidade entre órgãos altos, não se pode descartar a possibilidade de a agregação das anteras também ser uma estratégia para diminuir a taxa de auto interferência sexual no morfo brevistilo. Devido à complexidade corpórea de uma abelha ser maior do que o bico de um beija-flor, uma vez que elas possuem ornamentações, tais como escopas, antenas, sessões corporais

etc., as abelhas teriam mais chances de autopolinizar uma flor brevistila em decorrência das anteras estarem dispostas logo acima do estigma, sobretudo em um estigma com lóbulos longos (Furtado et al., 2023). À medida que uma abelha adentrasse a corola para acessar o néctar, as anteras estando apresentadas circularmente na entrada da corola permitiria com que o pólen fosse facilmente empurrado para o próprio estigma localizado logo abaixo (Darwin, 1977). Portanto, a apresentação agregada das anteras seria uma maneira de deixar o caminho livre para a entrada da abelha e, conseqüentemente, diminuir as taxas de autointerferência sexual. Não curiosamente, as outras duas espécies de Rubiaceae que possuem a mesma arquitetura das anteras também são polinizadas por abelhas (Matias et al., 2016; Furtado., 2015).

Wesselingh et al., (2000), ao estudarem três espécies florais diferentes, mas com morfologia semelhante (epipétalas e tubulares) visitadas pela abelha *Bombus ephippiatus*, demonstraram que em *Palicourea brenesii* a deposição de pólen pelas anteras de flores brevistilas ocorre de forma mais eficiente nas abelhas quando comparada à deposição pelas anteras longistilas. Esse resultado evidencia a importância do posicionamento exerto das anteras na eficácia da transferência de pólen em interações com abelhas. De forma semelhante, *Primula sieboldii* apresenta maior eficiência no fluxo de pólen por meio dos órgãos sexuais altos quando visitada por *Bombus diversus*. Nesse caso, o posicionamento mais externo dos órgãos favoreceu a deposição de pólen ao longo da cabeça e da probóscide da abelha, uma vez que a corola relativamente estreita representou um obstáculo à inserção dos órgãos da abelha (Nishihiro et al., 2000). Ambos os estudos destacaram como a disposição espacial dos órgãos reprodutivos em flores tubulares influencia diretamente a eficiência da polinização por abelhas, padrão que também se reflete nas características florais observadas em *P. rigida*. Esse padrão sugere uma possível especialização entre os morfos florais e seus respectivos polinizadores relacionada à posição dos órgãos reprodutivos e às características estruturais da flor. Os órgãos altos, que apresentam a HR 3D, parecem estar mais associados à polinização por abelhas, enquanto os órgãos baixos, inseridos na corola tubular e estreita, favorecem a polinização por beija-flores. A morfologia floral de *P. rigida*, com corola longa e estreita, representa um obstáculo ao acesso das abelhas aos órgãos reprodutivos baixos, mas é altamente compatível com a polinização por beija-flores. Esse padrão já foi demonstrado em manipulações experimentais com espécies de *Penstemon* (Plantaginaceae), nas quais o estreitamento da corola, a ausência de plataforma de pouso e o posicionamento pendular das flores desencorajaram visitas de abelhas, mas favoreceram o fluxo de pólen promovido por beija-flores (Castellanos et al., 2003; Salas-Arcos et al., 2018).

A apresentação agregada das anteras nos morfos brevistilos de *P. rigida* pode representar uma vantagem na relação com abelhas, conforme demonstrado por Thompson et al., (2003). Esse estudo evidenciou que, em plantas visitadas por abelhas, a doação de pólen ocorre de maneira mais volumosa, pois esses insetos também utilizam o pólen como recurso alimentar. Como grande parte do pólen coletado pelas abelhas é armazenado em seus corpos e não chega ao estigma, a eficiência do fluxo de pólen entre flores pode depender da liberação de um volume maior de pólen. Talvez, por esse motivo, o pólen brevistilo de *P. rigida* aparece em maior quantidade em comparação ao longistilo nas duas faces do corpo dos polinizadores. A entrega de uma carga polínica maior em flores que possuem anteras agregadas é comum (Ren, 2008), pois, por estarem juntas, acabam depositando uma massa de pólen nos polinizadores, ao contrário de flores com anteras não-agregadas que liberam pólen de forma menos concentrada. Ademais, a deposição mais volumosa e concentrada acaba estimulando um maior espalhamento dos grãos ao longo de todo o corpo, o que pode explicar a maior taxa de polinização ilegítima do morfo brevistilo, independentemente do tipo de polinizador (Raupp et al., 2020). Porém, quando se trata da polinização por beija-flores, estudos indicam que uma quantidade significativamente maior de pólen de longistilo é depositada no estigma das flores brevistilas quando o beija-flor é o polinizador (Furtado et al., 2023). Apesar de possuírem uma estrutura corporal mais simplificada do que as abelhas, os beija-flores promovem um fluxo eficiente de pólen nos órgãos baixos, pois sua morfologia favorece um contato mais direto e preciso com essas estruturas. Esse padrão de reciprocidade é mais evidente nos órgãos baixos do que nos altos, o que pode justificar a existência da HR 3D nos órgãos altos (Raupp et al., 2020).

Outro fator relevante definido a partir de observações é que, embora os filetes das anteras brevistilas sejam epipétalos e o estilete do estigma longistilo tenha a inserção terminal, as extremidades desses órgãos não permanecem rigidamente posicionadas nesse eixo, mas sim se inclinam em direção à face superior da flor. Ademais, o estigma longistilo aparenta ter um posicionamento mais uniforme, com menor dispersão dos dados, o que pode contribuir e facilitar a deposição de pólen durante a visita dos polinizadores (Figura 4). Por outro lado, as anteras brevistilas parecem ocupar uma área maior da corola, maximizando a área de dispersão de pólen, facilitando o contato com o polinizador e, conseqüentemente, do pólen com o estigma oposto. Essa disposição sugere um certo grau de reciprocidade além da altura, em três níveis, potencializando o fluxo de pólen (Figura 4). A análise conjunta dos dados sugere que *P. rigida* apresenta hercogamia recíproca tridimensional nos órgãos altos, com maior variabilidade posicional e angulação voltada para a face superior da corola. Já os órgãos baixos têm um posicionamento mais estável e preciso.

Essa tridimensionalidade nos órgãos altos pode estar relacionada a uma maior imprecisão de posicionamento, surgindo como um fator para equilibrar o fluxo de pólen nos órgãos mais inacurados em comparação com os baixos, bastante recíprocos.

Nossos resultados corroboram com pesquisas prévias que demonstram que a deposição de pólen é diferente no corpo dos polinizadores de acordo com o posicionamento das anteras nos morfos. Esse padrão de agrupamento e deslocamento das anteras parece ter uma grande relevância funcional, especialmente por indicar uma estratégia para otimizar o contato com os polinizadores, como também observado em outras espécies com estruturas estaminais agrupadas (Ren, 2008). Nesses casos, a disposição dos estames tende a facilitar o posicionamento do pólen nos visitantes e a reduzir o risco de autopolinização, enquanto permite um espaço funcional dentro da flor para a movimentação dos polinizadores (Yang et al., 2004). Além disso, os dados aqui fornecidos apresentam uma nova perspectiva na relação entre morfos e polinizadores, indicando que abelhas estão mais associadas aos órgãos altos com hercogamia recíproca tridimensional, enquanto os beija-flores favorecem o fluxo de pólen nos órgãos baixos, mais recíprocos. Por outro lado, destaca um novo aspecto ao analisar como a deposição se diferencia em relação a complexidade da estrutura corporal do visitante (beija-flor e abelha) demonstrando que, de certa forma, estruturas mais simples, sem reentrâncias ou cerdas podem contribuir para uma deposição mais simétrica, com o dorso recebendo mais pólen brevistilo e o ventre ambos os morfos, como é encontrado no bico do beija-flor.

REFERÊNCIAS

- Anderson, W.R., 1973. A morphological hypothesis for the origin of heterostyly in the Rubiaceae. *Taxon* 22(5–6), 537–542. <https://doi.org/10.2307/1218628>
- Armbruster, W.S., Péres-Barrales, R., Arroyo, J., Edwards, M.E., Pablo, V., 2006. Three-dimensional reciprocity of floral morphs in wild flax (*Linum suffruticosum*): a new twist on heterostyly. *New Phytol.* 171(3), 581–590. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01749.x>
- Armbruster, W.S., Bolstad, G.H., Hansen, T.F., Keller, B., Conti, E., Pélabon, C., 2017. The measure and mismeasure of reciprocity in heterostylous flowers. *New Phytol.* 215, 906–917.
- Braga, B.L.P., Matias, R., Consolaro, H., Souza, J.T., Almeida, N.M., 2022. Inaccuracy of sexual organ position and spatial variation of styles in monomorphic enantiostylous flowers of *Senna*

rugosa (Fabaceae–Caesalpinioideae). Flora 293, 152112.
<https://doi.org/10.1016/j.flora.2022.152112>

Castellanos, M.C., Wilson, P., Thomson, J.D., 2003. Pollen transfer by hummingbirds and bumblebees, and the divergence of pollination modes in *Penstemon*. *Evolution* 57, 2742–2752.
<http://www.jstor.org/stable/3448727>

Consolaro, H., Toledo, R.D.C.P., Ferreguti, R.L., Hay, J., Oliveira, P.E., 2009. Distyly and homostyly in four *Palicourea* Aubl. (Rubiaceae) species from the Cerrado of Central Brazil. *Braz. J. Bot.* 32, 655–667. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042009000400004>

Darwin, C., 1877. The different forms of flowers on plants of the same species. John Murray, London.

Feinsinger, P., Busby, W.H., 1987. Pollen carryover: experimental comparisons between morphs of *Palicourea lasiorrachis* (Rubiaceae), a distylous, bird-pollinated, tropical treelet. *Oecologia* 73, 231–235. <https://doi.org/10.1007/BF00377512>

Fenster, C.B., Armbruster, W.S., Wilson, P., Dudash, M.R., Thomson, J.D., 2004. Pollination syndromes and floral specialization. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 35, 375–403. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132347>

Fetscher, A.E., 2001. Resolution of male–female conflict in an hermaphroditic flower. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 268, 525–529.

Fetscher, A.E., Kohn, J.R., 1999. Stigma behavior in *Mimulus aurantiacus* (Scrophulariaceae). *Am. J. Bot.* 86, 1130–1135.

Fishbein, M., Venable, D.L., 1996. Diversity and temporal change in the effective pollinators of *Asclepias tuberosa*. *Ecology* 77, 1061–1073. <https://doi.org/10.2307/2265576>

Freeman, D.C., Doust, L., El-Keblawy, A., Miglia, K.J., McArthur, E.D., 1997. Sexual specialization and inbreeding avoidance in the evolution of dioecy. *Bot. Rev.* 63, 65–92. <https://doi.org/10.1007/BF02858506>

Furtado, M.T., Matias, R., Pérez-Barrales, R., Consolaro, H., 2023. Complementary roles of hummingbirds and bees: Pollen pickup, pollen deposition, and fruit production in the distylous *Palicourea rigida*. *Am. J. Bot.* e16194.

- Furtado, M.T., Matias, R., Pérez-Barrales, R., Consolaro, H., 2021. Do reciprocal herkogamy and pollinators affect the legitimate pollen flow in distylous species? *Bot. J. Linn. Soc.* 196(4), 524–539. <https://doi.org/10.1093/botlinnean/boab004>
- Furtado, M.T.R., 2015. A funcionalidade da distília em *Psychotria nitidula* Cham. & Schltdl. (Rubiaceae): o papel do polinizador na transferência de pólen. M.Sc. Thesis. Universidade de Brasília, Brasília.
- Ganders, F.R., 1979. The biology of heterostyly. *N. Z. J. Bot.* 17, 607–635.
- García-Robledo, C., 2008. Asymmetry in pollen flow promotes gender specialization in morphs of the distylous neotropical herb *Arcytophyllum lavarum* (Rubiaceae). *Evol. Ecol.* 22, 743–755.
- González, C., Ornelas, J.F., Jiménez, L., 2005. Between-year changes in functional gender expression of *Palicourea padifolia* (Rubiaceae), a distylous, hummingbird-pollinated shrub. *Ann. Bot.* 95, 371–378. <https://doi.org/10.1093/aob/mci026>
- Hamilton, C.W., 1990. Variations on a distylous theme in mesoamerican *Psychotria* subgenus *Psychotria* (Rubiaceae). *Mem. N. Y. Bot. Gard.* 55, 62–75.
- Harder, L.D., Barrett, S.C.H., Cole, W.W., 1993. Pollen removal from tristylous *Pontederia cordata*: effects of anther position and pollinator specialization. *Ecology* 74(4), 1059–1072. <https://doi.org/10.2307/1940476>
- Käfer, J., Marais, G.A., Pannell, J.R., 2017. On the rarity of dioecy in flowering plants. *Mol. Ecol.* 26(5), 1225–1241. <https://doi.org/10.1111/mec.14020>
- Köppen, W., 1948. *Climatología: un estudio de los climas de la Tierra*. Fondo de Cultura Económica, México.
- Lau, P., Bosque, C., 2003. Pollen flow in the distylous *Palicourea fendleri* (Rubiaceae): an experimental test of the disassortative pollen flow hypothesis. *Oecologia* 135, 593–600. <https://doi.org/10.1007/s00442-003-1216-5>
- Lloyd, D.G., Webb, C.J., 1992. The evolution of heterostyly. In: Barrett, S.C.H. (Ed.), *Evolution and Function of Heterostyly*. Springer, Berlin, pp. 151–178.

- Machado, A.O., Silva, A.P., Consolaro, H., Barros, M.A.G., Oliveira, P.E., 2010. Breeding biology and distyly in *Palicourea rigida* H.B. & K. (Rubiaceae) in the Cerrados of Central Brazil. *Acta Bot. Bras.* 24(3), 686–696. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062010000300012>
- Matias, R., Oliveira, A.S., Furtado, M.T., Sá, T., Rodrigues, E.B., Oliveira, P.E., Consolaro, H.N., 2016. Sistema reprodutivo atípico de duas espécies de Rubiaceae: distília com autoincompatibilidade parcial no morfo brevistilo? *Rodriguésia* 67(2), 357–368. <https://doi.org/10.1590/2175-7860201667207>
- Matias, R., Furtado, M.T., Consolaro, H., Pérez-Barrales, R., 2021. Variation in pollen sterility and gender specialization: an investigation with distylous species of *Erythroxylum* (Erythroxylaceae). *Plant Biol.* 23, 947–955. <https://doi.org/10.1111/plb.13310>
- Nicholls, M.S., 1986. Population composition, gender specialization, and the adaptive significance of distyly in *Linum perenne* (Linaceae). *New Phytol.* 102, 209–217. <http://www.jstor.org/stable/2484994>
- Nicholls, M.S., 1987. Pollen flow, self-pollination and gender specialization: factors affecting seed-set in the tristylous species *Lythrum salicaria* (Lythraceae). *Pl. Syst. Evol.* 156(3–4), 151–157. <https://doi.org/10.1007/BF00936070>
- Nishihiro, J., Washitani, I., Thomson, J.D., Thomson, B.A., 2000. Patterns and consequences of stigma height variation in a natural population of a distylous plant, *Primula sieboldii*. *Funct. Ecol.* 14, 502–512. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2435.2000.00449.x>
- R Core Team, 2025. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Raupp, P.P., Matias, R., Furtado, M.T., Consolaro, H., 2020. The role of distyly in pollen flow of the hummingbird pollinated *Palicourea rigida* (Rubiaceae). *Flora* 271, 151681. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2020.151681>
- Rech, A.R., Achkar, M.T., Jorge, L.R., Armbruster, W.S., Almeida, O.J.G., 2020. The functional roles of 3D heterostyly and floral visitors in the reproductive biology of *Turnera subulata* (Turneroideae: Passifloraceae). *Flora* 264, 151559. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2020.151559>

- Ren, M.X., 2008. Stamen fusion in plants: diversity, adaptive significance, and taxonomic implications. *J. Syst. Evol.* 46(6), 761–771. <https://doi.org/10.3724/SP.J.1002.2008.06184>
- Rodrigues, E.B., Consolaro, H., Pérez-Barrales, R., Oliveira, P.E., 2022. Evolution of distyly breakdown in Palicoureeae Robbr. & Manen and Psychotrieae Cham. & Schltdl. (Rubiaceae). *Acta Bot. Bras.* 36, e2021abb0242. <https://doi.org/10.1590/0102-33062021abb0242>
- Roquer-Beni, L., Arnan, X., Rodrigo, A., Bosch, J., 2022. What makes a good pollinator? Relationship between pollinator traits and pollination effectiveness in apple flowers. *Entomol. Gen.* 42, 875–882. <https://doi.org/10.1127/entomologia/2022/1571>
- Sá, T., Furtado, M.T., Ferrero, V., Pérez-Barrales, R., Rodrigues, E., Santos, I.S., Consolaro, H., 2016. Floral biology, reciprocal herkogamy and breeding system in four *Psychotria* species (Rubiaceae) in Brazil. *Bot. J. Linn. Soc.* 182, 731–746. <https://doi.org/10.1111/boj.12476>
- Salas-Arcos, L.C., Lara, C., Castillo-Guevara, C., Cuautle, M., Ornelas, J.F., 2018. Pro-bird floral traits discourage bumblebee visits to *Penstemon gentianoides* (Plantaginaceae), a mixed-pollinated herb. *Naturwissenschaften* 106, 1–9. <https://doi.org/10.1007/s00114-018-1595-4>
- Silva, A.P., 1995. Biologia reprodutiva e polinização de *Palicourea rigida* H.B.K. (Rubiaceae). Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, Brasília.
- Stone, L., Thomson, J.D., 1994. The evolution of distyly: pollen transfer in artificial flowers. *Evolution* 48, 1595–1606. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1994.tb02198.x>
- Thomson, J.D., 2003. Pollen removal and deposition by honeybee and bumblebee visitors to apple and almond flowers. *J. Appl. Ecol.* 38, 1032–1044. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2664.2001.00684.x>
- Turketti, S.S., Esler, K.J., Dreyer, L.L., 2012. Three-dimensional reciprocity: a new form of tristily in South African *Oxalis* (Oxalidaceae) species and its implications for reproduction. *S. Afr. J. Bot.* 78, 195–202. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2011.06.014>
- Valois-Cuesta, H., Soriano, P.J., Ornelas, J.F., 2012. Gender specialization in *Palicourea demissa* (Rubiaceae), a distylous, hummingbird-pollinated treelet. *Pl. Syst. Evol.* 298(5), 975–984. <https://doi.org/10.1007/s00606-012-0607-7>

- Vieira, D.L.M., Coutinho, A.G., Rocha, G.P.E., 2012. Resprouting ability of dry forest tree species after disturbance does not relate to propagation possibility by stem and root cuttings. *Restor. Ecol.* 21, 305–311.
- Waser, N.M., 1993. Population structure, optimal outbreeding, and assortative mating in angiosperms. In: Thornhill, N.W. (Ed.), *The Natural History of Inbreeding and Outbreeding: Theoretical and Empirical Perspectives*. University of Chicago Press, Chicago, pp. 173–199.
- Wesselingh, R.A., Burgers, H.C.M., Den Nijs, H.C.M., 2000. Bumblebee pollination of understorey shrub species in a tropical montane forest in Costa Rica. *J. Trop. Ecol.* 16(5), 657–672. <https://www.jstor.org/stable/3068678>
- Willmer, P.G., Cunnold, H., Ballantyne, G., 2017. Insights from measuring pollen deposition: quantifying the pre-eminence of bees as flower visitors and effective pollinators. *Arthropod-Plant Interactions* 11, 411–425. <https://doi.org/10.1007/s11829-017-9528-2>SpringerLink+2
- Yang, S.X., Yang, C.F., Zhang, T., Wang, Q.F., 2004. A mechanism facilitates pollination due to stigma behavior in *Campsis radicans* (Bignoniaceae). *Acta Bot. Sin.* 46, 626–630.

VERSÃO DO CAPÍTULO EM INGLÊS

Capítulo a ser submetido a revista Flora

Aggregated anther presentation of the short-styled morph: ecological and morphological implications in the pollen flow process in *Palicourea rigida* Kunth

I.C. Pereira¹, R. Matias^{2,4}, M.T. Furtado^{2,5}, H.N. Consolaro^{3,6}

1. Graduate Program in Botany, University of Brasilia, Institute of Biological Sciences, Department of Botany, Brasília, Distrito Federal, Brazil, isadora.bioufg@gmail.com; 2. Federal University of Jataí, Biosciences Institute, Jatobá Campus, Jataí, Goiás, Brazil, 3. Federal University of Catalão, Biotechnology Institute, Catalão, Goiás. Brazil; 4. raphael.silva@ufj.edu.br; 5. marcotulio.bio@gmail.com; 6. helderconsolaro@ufcat.edu.br

Correspondence:

I.C. Pereira

University of Brasilia, Institute of Biological Sciences, Department of Botany, Brasília, Distrito Federal, Brazil.

Email: isadora.bioufg@gmail.com

Highlights

1. Short- and long-styled floral morphs show distinct pollen deposition patterns.
2. Three-dimensional herkogamy occurs only in the high organs.
3. Bees are more associated with upper organs; hummingbirds with lower organs.
4. Aggregated stamens in the short-styled morph increase pollen volume and spread.
5. Pollinator body structure influences pollen deposition symmetry.

ABSTRACT

In distylous species, herkogamy plays a key role in promoting legitimate pollen flow. In *Palicourea rigida* (Rubiaceae), we recorded an unusual spatial arrangement of the upper sexual organs in the short-styled morph, characterized by the aggregation of the anthers and displacement of the long-styled stigma. This three-dimensional herkogamy appears to function as a compensatory mechanism for the low reciprocity and imprecise pollen deposition frequently observed between the upper organs. The flowers are mostly visited by hummingbirds and bees. Although both are effective in mediating pollen flow, they seem to interact differently with floral morphology: hummingbirds appear to more efficiently promote legitimate pollen flow between the lower organs, whereas bees operate more intensively among the upper organs, where three-dimensional herkogamy occurs, due to differences in pollen deposition on their bodies. Additionally, anther aggregation favors a more voluminous release of pollen, especially on the dorsal region of the pollinators' bodies, increasing the chances of contact with the opposite stigma. Our data show that the upper organs exhibit greater positional variability and angulation toward the upper side of the corolla, whereas the lower organs are more stable and precise. The results suggest a functional specialization between morphs and pollinator types and further expand the concept of three-dimensional herkogamy to tubular flowers, traditionally associated only with two-dimensional reciprocity.

Keywords: distyly; pollination; cerrado; three-dimensional herkogamy; heterostyly.

INTRODUCTION

Palicourea rigida Kunth (Rubiaceae) is an angiosperm species, typically distylous, common in the Brazilian Cerrado and primarily pollinated by hummingbirds and bees (Machado et al., 2010; Furtado et al., 2023). As a distylous species, each individual bears a specific floral morph: the short-styled morph, in which the anthers are positioned above the stigma, and the long-styled morph, in which the stigma is positioned above the anthers (Ganders, 1979). Due to this floral architecture, the heights of the anthers and stigmas across morphs tend to correspond, a morphological trait known as reciprocal herkogamy (RH) (Hamilton, 1990). According to Darwin's prediction (1877), RH plays a fundamental role in promoting legitimate cross-pollination (i.e., inter-morph pollen transfer) by ensuring the deposition of pollen grains from each morph onto specific regions of the pollinators' bodies, which will naturally contact the stigma of the opposite morph.

In most distylous species of Rubiaceae, the stamens of both morphs are epipetalous and are homogeneously arranged in a circular pattern along the inner wall of the corolla tube, with the pistil located centrally (Anderson, 1973). Although *P. rigida* exhibits the same general floral configuration as other members of the family, the spatial arrangement of the sexual organs differs, particularly regarding the positioning of the upper organs (i.e., short-styled stamens vs. long-styled pistil). In the short-styled morph, the free portions of the filaments are curved, resulting in an aggregate positioning of the anthers at the upper region of the corolla entrance. Similarly, in the long-styled morph, the style is slightly displaced to occupy this same upper region of the corolla, creating a spatial correspondence between the sexual organs (see details in Fig 1A, B; 2C, D). Interestingly, the morphological arrangement of the lower organs (i.e., long-styled stamens vs. short-styled pistil) follows the same pattern observed in other distylous Rubiaceae. However, the distinct configuration of the upper organs may influence pollen deposition patterns on the pollinators' bodies and potentially affect inter-morph pollen flow. These morphological characteristics suggest the possibility of some degree of functional specialization between morphs in *P. rigida*, as previously documented in other heterostylous species (González et al., 2005; Matias et al., 2021; Nicholls, 1986; Valois-Cuesta et al., 2012).

Floral morphology, combined with other factors such as differential resource allocation and pollinator inefficiency, may disrupt pollen flow and contribute to sexual specialization in distylous

species (Freeman et al., 1997; Käfer et al., 2017; Nicholls, 1987). While some studies on pollen flow in distylous plants report asymmetric inter-morph pollen transfer (Stone et al., 1994; Lau & Bosque, 2003; García-Robledo, 2008), others describe symmetric patterns (Lloyd & Webb, 1992). However, few have explored the underlying causes of such balance or imbalance. In certain species, morphs exhibit unequal reproductive roles, with the short-styled morph tending to function more as the pollen donor (i.e., more male-biased), while the long-styled morph exhibits higher fruit production efficiency (Freeman et al., 1997; Käfer et al., 2017). In *Lythrum salicaria* (Lythraceae), a tristylous species, the short-styled morph produces fruits with low germination rates, suggesting a greater efficiency in male function, while the mid-styled morph is more efficient in producing fruits with high germination rates (Nicholls, 1987). Such specialization may be further intensified when pollinator inefficiency affects pollen flow. In cases of asymmetric pollen transfer, when there is a mismatch between the potential and actual functions of the morphs, sexual specialization may be favored (Valois-Cuesta, 2012). To date, none of these phenomena have been observed in *P. rigida*. Most populations are isoplethic (Machado et al., 2010), inter-morph pollen flow is symmetric (Raupp et al., 2020), and there is no functional difference between morphs: both produce similar amounts of pollen (Silva et al., 1995) and show comparable fruit and seed production rates (Furtado et al., 2023). Therefore, the specific architecture of the upper sexual organs in *P. rigida* likely plays an as-yet-unknown role in the dynamics of pollination and the functional efficiency of each morph, which may ultimately explain its distinctive floral morphology.

Although Darwin (1877) addressed reciprocal herkogamy (RH) in a single linear dimension namely, the height of anthers and stigmas his theory already hinted at a morphological particularity in the sexual organs of *Linum grandiflorum* (Linaceae) that suggested a possible three-dimensional aspect to organ reciprocity. According to the expectations of three-dimensional RH, beyond differences in height, there is also an angular displacement of the sexual organs within the flower. This combination of height and angular position creates a more complex spatial separation, which further restricts self-pollination and promotes legitimate pollen transfer (Armbruster et al., 2006; Rech et al., 2020; Turketti et al., 2012). Three-dimensionality is typically associated with species bearing open corollas, since bidimensional positioning alone would be insufficient to ensure cross-pollination in such floral morphologies, and thus unnecessary in species with tubular flowers. In a study on *Turnera subulata* (Turneraceae) (Rech et al., 2020), researchers investigated the effect of three-dimensional floral architecture on pollen deposition on pollinator bodies and its impact on legitimate pollination. The results showed that pollen from the short-styled morph was predominantly deposited on the abdomen of bee visitors, while long-styled pollen was more often

found on their heads, confirming that three-dimensional RH enhances intermorph pollen transfer. Similarly, in *Linum suffruticosum* (Armbruster et al., 2006), it was demonstrated that the highest degree of reciprocity between anthers and stigmas was not determined by height, but by their tridimensional positioning specifically, the degree of filament and style rotation. That study also showed that three-dimensionality promoted sectorial pollen deposition on pollinator bodies, with short-styled anthers depositing pollen on the dorsal region and long-styled ones on the ventral region, thereby increasing the frequency of legitimate pollination. In Oxalidaceae, three-dimensional RH was first proposed in two tristylous species of *Oxalis* (Turketti et al., 2012). In all these cases, the studies sought to describe and demonstrate the functional relevance of three-dimensional reciprocal herkogamy (3D RH) in the reproductive success of distylous plants through more targeted pollen placement on pollinators' bodies.

Three-dimensionality in Rubiaceae has never been investigated, possibly due to the prevalence of tubular corollas in this group and the rarity of aggregated anther presentation, which has only been reported for *Psychotria nitidula* (Furtado, 2015), *Palicourea deflexa* (Matias et al., 2016), and *P. rigida*. It is known that in *Palicourea* species, floral morphology and pollinator behavior particularly of hummingbirds and bees play specific roles in the pollination process (Consolaro et al., 2009; Machado et al., 2010; Raupp et al., 2020; Furtado et al., 2021, 2023). Pollen flow studies in *Palicourea* species have demonstrated that interactions between different pollinator groups and floral morphs can generate significant variation in pollen transfer (Fishbein & Venable, 1996; Wilmer et al., 2017; Roquer-Beni et al., 2022), influencing not only fruit production but also plant adaptation to local environments and the selective pressures exerted by pollinators (Fenster et al., 2004; Waser et al., 1993). In *P. lasiorrachis*, hummingbird pollination revealed that when short-styled flowers functioned as pollen donors, the amount of pollen transferred was lower compared to long-styled flowers. Nevertheless, the pollen grains were more evenly distributed on long-styled stigmas (Feinsinger et al., 1987). Broader studies on stamen fusion suggest that aggregated anther presentation tends to enhance pollen deposition precision on pollinators, thereby increasing cross-pollination efficiency and reproductive success (Ren, 2008). In *P. rigida*, one population predominantly visited by hummingbirds exhibited high rates of legitimate pollen transfer to both morphs (Furtado et al., 2021), in contrast with *P. padifolia* and *P. demissa*, where hummingbirds tended to deposit more legitimate pollen on short-styled stigmas than on long-styled ones. Furthermore, it was shown that *P. rigida* populations visited exclusively by hummingbirds received more legitimate pollen than those visited by both hummingbirds and bees (Furtado et al., 2023).

The influence of three-dimensional aspects of reciprocal herkogamy (RH) and their relationship with pollinators in determining pollen flow efficiency remains poorly understood, particularly within Rubiaceae a family characterized by tubular corollas. Given the diversity of interactions between flowers and pollinators and the variability in pollen deposition, it is essential to investigate how these structural features of floral biology can modulate pollination efficiency and plant reproduction. Therefore, the aim of the present study was to investigate the ecological and evolutionary significance of three-dimensionality in the reciprocal herkogamy of *P. rigida*, by examining horizontal and vertical variation in anther and stigma positioning and its effect on reciprocity between upper and lower organs. We also assessed whether differences between morphs in anther aggregation and stigma displacement affect pollen deposition on the bodies of hummingbirds and bees. Several hypotheses were tested in relation to these objectives: (1) Anther aggregation at the upper portion of the corolla tube entrance in short-styled flowers facilitates the concentrated deposition of pollen on the dorsal region of the visitor's body, whereas the distribution of anthers around the inner wall of the corolla tube in the long-styled morph results in pollen deposition on both the dorsal and ventral regions; (2) The upward displacement of the stigma in long-styled flowers aligns with the aggregated anther positioning in short-styled flowers, leading to greater reciprocity between upper organs; (3) The three-dimensionality of HR between upper organs is not a factor leading to imbalances in inter-morph pollen flow; (4) Since Furtado et al., (2021) found that *P. rigida* populations visited by bees exhibited asymmetrical inter-morph pollen flow, while those visited by hummingbirds showed symmetrical flow, we expect that in hummingbird visits, pollen from the short-styled morph will be deposited predominantly on the dorsal region of the body, while in bee visits, it will be more randomly distributed across the head and proboscis.

MATERIAL AND METHODS

Study area and focal species

Floral branches of *P. rigida* were collected from two populations located in typical Cerrado vegetation in the municipality of Catalão, Goiás, Brazil. These are the same populations previously studied by Raupp et al., (2020) and Furtado et al., (2021, 2023): Fazenda Pé-do-Morro, owned by the Federal University of Catalão (UFCAT) (18°06'51.9" S, 47°59'55.6" W), and the Pasto do Pedrinho Ecological Reserve (18°09'46" S, 47°56'31" W). The climate of the region is markedly seasonal, with a cool and dry season from May to September and a hot and rainy season from October to April (Köppen, 1948). The average annual precipitation is 1,522 mm, with 88% of rainfall occurring between October and March, and the mean annual temperature is 23°C (Vieira et al., 2012).

Palicourea rigida is a shrubby to small tree species reaching up to 3.5 m in height, commonly found in the Cerrado biome. Its flowers are arranged in pedunculate terminal inflorescences and have a tubular yellow-orange to yellow corolla approximately 13 mm long (Fig 2A–D). The presence of two distinct floral morphs (Fig 2C, D) is a typical feature of the species, with distyly well established in its populations (Machado et al., 2010; Raupp et al., 2020; Furtado et al., 2021, 2023; Rodrigues et al., 2022). Stamens in both morphs are epipetalous, but they are included in the long-styled morph and exserted in the short-styled morph (Fig 2D; 3A, B). Additionally, as previously described, anthers in the short-styled morph are aggregated at the upper portion of the corolla (Fig 2D; 3B), while those in the long-styled morph are circularly arranged along the inner corolla wall (Fig 3A). The pistil of the short-styled morph is fully included and has larger stigmatic lobes than that of the long-styled morph (Furtado et al., 2021). In the long-styled morph, the pistil is slightly displaced toward the upper side of the corolla opening (Fig 2C; 3A). Studies on reproductive biology and the pollination system of *P. rigida* have shown that previously studied populations exhibit an equal morph ratio (isoplethy), self-incompatibility, higher reciprocity between lower-level sexual organs (long-styled anther vs. short-styled stigma), a greater amount of legitimate pollen received by the short-styled morph, and that hummingbirds are more efficient pollinators than bees in facilitating inter-morph pollen transfer (Fig 2E, F). Additionally, greater organ reciprocity and larger stigmatic lobes are associated with increased legitimate pollen loads (Raupp et al., 2020; Furtado et al., 2021, 2023).

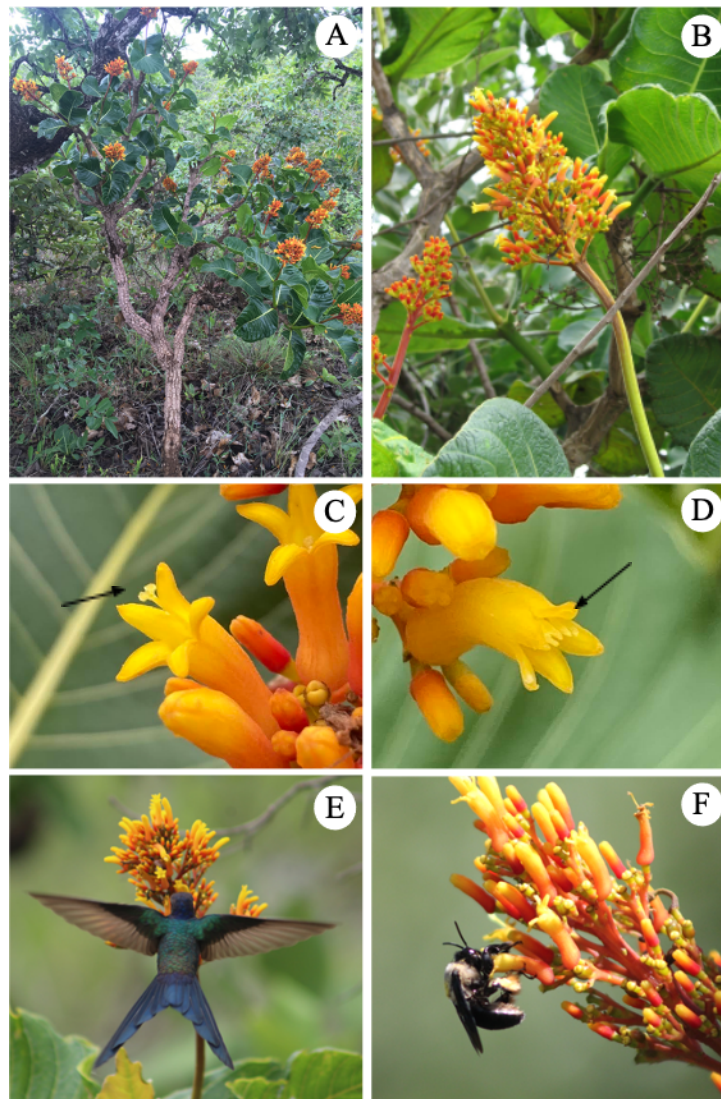


Figure 2. General aspects of *Palicourea rigida* (Rubiaceae). A: Shrubby to small tree habit, approximately 2.5 m in height. B: Detail of the inflorescence and flower coloration. C: Long-styled morph with the style slightly displaced toward the upper side of the corolla opening (black arrow). D: Short-styled morph showing exerted stamens and the aggregated arrangement of anthers at the corolla entrance (black arrow). E: The hummingbird *Eupetomena macroura* visiting flowers. F: The bee *Epicharis flava* visiting flowers.

Experiments

The main data for this study were obtained in the laboratory through simulated pollinator visits to flowers of *P. rigida*. Floral branches bearing flower buds were collected in the field, immediately placed in containers with water, and transported to the UFCAT laboratory. Branches were kept near a well-lit area, and as the flowers opened, simulations and photographs were carried out (Fig 1A, B).

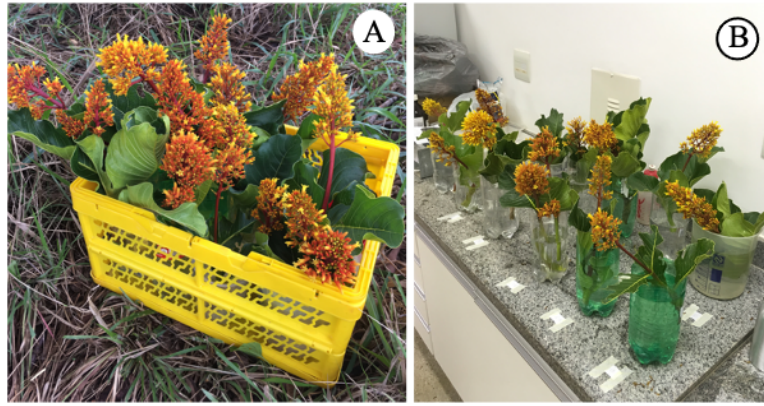


Figure 1. Inflorescence branches of *Palicourea rigida* (Rubiaceae) collected at Fazenda Pé-do-Morro, Catalão, GO. A: Branches collected and stored in containers with water for transport to the Laboratory of Reproductive Biology of Angiosperms at UFCAT. B: Branches of both floral morphs placed individually in water-filled containers for simulated pollinator visits and photographic documentation for subsequent floral measurements in the laboratory.

Field collection and laboratory experiments were conducted between October and January during the flowering periods of *Palicourea rigida* populations in 2023 and 2025. In 2024, however, low rainfall combined with high temperatures resulted in an atypical flowering pattern, with flowers wilting rapidly and reduced flowering intensity.

Three-dimensionality in reciprocal herkogamy

Reciprocal herkogamy, specifically in the bidimensional plane (height of sexual organs), has already been analyzed in the same populations by Raupp et al., (2020), who found that the lower organs (long-styled anthers vs. short-styled stigmas) are more reciprocal than the upper ones. In the present study, measurements focused specifically on assessing three-dimensionality, including: (1) vertical distance from the central region of the corolla opening to the location of each sexual organ – anthers and stigma (Fig 3A, B); (2) horizontal distance from the central region of the corolla opening to the location of each organ (Fig 3C, D); (3) displacement of the organs from the center of the corolla opening (Fig 3E, F) ; and (4) angle of the organs within a 0–360° range (Fig 3G, H). Measurements were taken using ImageJ software based on frontal-view photographs of the corolla opening (30 flowers per morph, one flower per individual) (Fig 3A–H). For horizontal distance, measurements to the right of the center were recorded as positive values, and to the left as negative; for vertical distance, values above the center were considered positive, and below, negative. Data on horizontal and vertical distance were used to calculate inaccuracy in organ positioning (see below). Angle and displacement measurements were used only for visual inspection, with a circular plot generated to assess organ dispersion within the flower, particularly

because angle (measured in degrees) differs from the other variables (measured in millimeters). All measurements were taken for all five anthers in each flower, and three points were used to represent the stigma (left, center, and right) in order to capture the entire stigmatic surface.

Index of sexual organ inaccuracy

The adaptive inaccuracy metric proposed by Armbruster et al., (2017) was used, as it provides a quantitative scale that reflects the functional impact of floral morphology on pollination efficiency and, consequently, on reproductive fitness. The index was calculated using the following formulas: for upper organs: [Inaccuracy of upper organs = (mean short-styled anthers + mean long-styled stigmas)² + variance of short-styled anthers + variance of long-styled stigmas] and for lower organs: [Inaccuracy of lower organs = (mean long-styled anthers + mean short-styled stigmas)² + variance of long-styled anthers + variance of short-styled stigmas] (Armbruster et al., 2017). As shown in the formulas, the inaccuracy index is decomposed into a maladaptive bias component (mean anthers + mean stigmas)² and an imprecision component (variance of anthers + variance of stigmas). These two components are summed to obtain the total inaccuracy value for each organ level (upper and lower). Values for maladaptive bias, imprecision, and total inaccuracy were calculated separately for horizontal and vertical distances. Subsequently, the horizontal inaccuracy value was added to the vertical inaccuracy value, within the same sexual organ level (upper or lower), to obtain the total inaccuracy for each height level (Braga et al., 2022). The closer the inaccuracy value is to zero, the lower the inaccuracy and the greater the reciprocity between sexual organs (Armbruster et al., 2017).

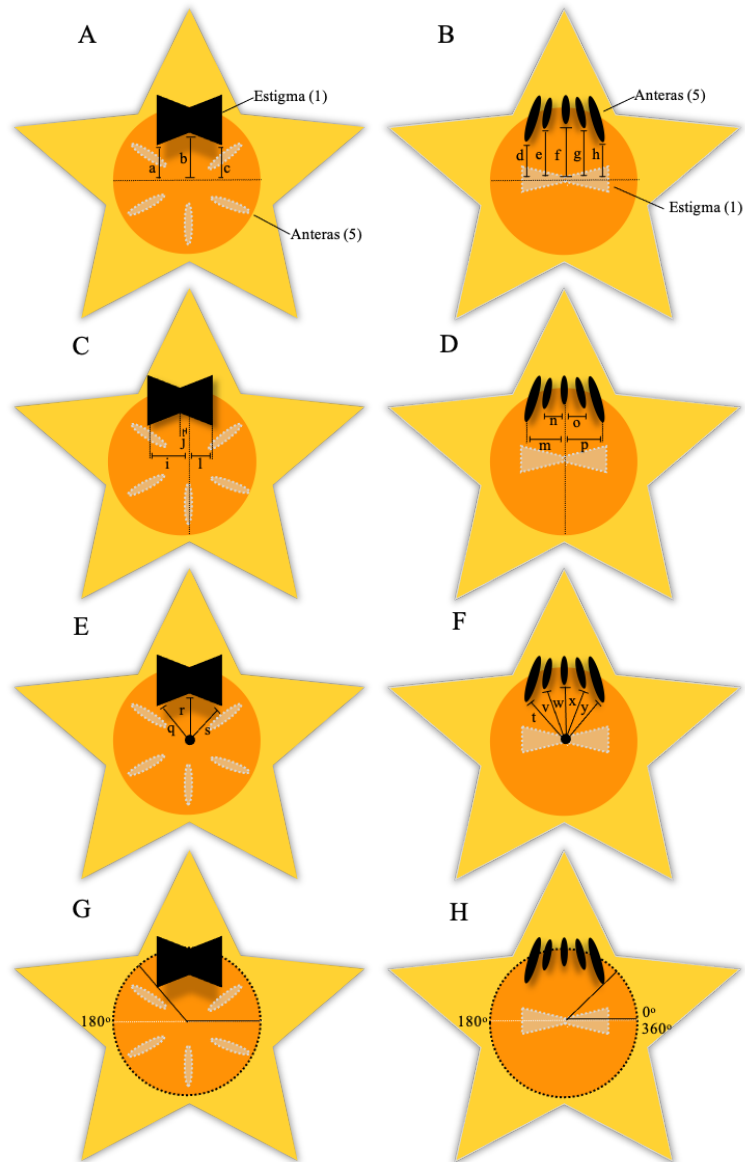


Figure 3. Floral architecture of the long-styled (A, C, E, G) and short-styled (B, D, F, H) morphs of *Palicourea rigida* (Rubiaceae). Upper-level organs are shown in black to highlight their position in the foreground, while lower-level organs are shown in gray, in the background. A: Diagram showing vertical distance measurements from the equatorial region of the corolla opening to the stigma, with three points corresponding to the center and both ends of the stigma (a–c). B: Diagram showing vertical distance measurements from the equatorial region of the corolla opening to each anther (d–h). C: Diagram showing horizontal distance measurements from the longitudinal center of the corolla opening to each part of the stigma (i–l). D: Diagram showing horizontal distance measurements from the longitudinal center of the corolla opening to each anther (m–p). E: Diagram showing the displacement of the stigma from the central region of the corolla opening, considering the three stigma points (q–s). F: Diagram showing the displacement of the anthers from the central region of the corolla opening (q–s). G and H: Diagram showing the angular positioning of anthers and stigma parts relative to the center of the corolla.

Pollen deposition on pollinator bodies

Pollen grain deposition on the bill of the hummingbird and on the body of the bee specifically the head and proboscis was analyzed through simulated visitation tests using one specimen each of the hummingbird *Eupetomena macroura* and the bee *Epicharis flava*, both considered major pollinators of *P. rigida* flowers (Furtado et al., 2023). The simulations were performed using taxidermied specimens, as capturing and handling live hummingbirds could induce high stress and potentially result in death, and capturing bees might alter their natural foraging behavior. Additionally, handling could negatively affect pollen deposition outcomes and also lead to the death of the animal. Similar simulation-based studies have previously been published by the same research group, such as Raupp et al., (2020) in *Flora* (<https://doi.org/10.1016/j.flora.2020.151681>) and Furtado et al., (2023) in the *American Journal of Botany* (<https://doi.org/10.1002/ajb2.16194>). The specimens used are part of the floral visitor collection of the Laboratory of Reproductive Biology of Angiosperms at UFCAT. Simulated visits for hummingbirds were carried out by partially inserting the bill into the floral tube, and for bees, the head and extended proboscis were inserted. Thirty simulated visits were performed for each pollinator species and floral morph. To ensure that the insertion depth of the bill or head/proboscis into the corolla tube resembled natural conditions, video recordings of floral visits in the field were used as references (Sony Handycam HDR-CX 405). After each simulated visit, pollen grains were removed from the pollinator's body using fuchsin gel and transferred to microscope slides, considering two body regions separately: dorsal and ventral. The number of pollen grains deposited in each region was then counted under a microscope. After each simulation, the specimen was cleaned to prepare for the next visitation, and fresh, undisturbed flowers were used in every simulation.

Statistical analyses

All statistical analyses in this study were conducted using R software (version 4.1.3; R Core Team, 2025). Generalized linear models (GLMs) with Poisson distribution were used to compare the number of pollen grains deposited by short-styled and long-styled flowers on the dorsal and ventral regions of pollinator bodies. Separate GLMs were performed for each pollinator group. The dependent variable was the total number of pollen grains deposited on the pollinator body, and the independent variables were floral morph (short-styled and long-styled) and pollinator body region (dorsal and ventral). The interaction between the two independent variables was also assessed. GLMs were performed using the lme4 package (Bates et al., 2019) and the glm function. Type III analysis of variance was used to determine the significance of each independent variable (floral morph and body region) and their interaction, using the Anova function from the car package (Fox

et al., 2019). The Ismeans function with Bonferroni adjustment from the emmeans package (Lenth, 2019) was used as a post hoc test.

RESULTS

Three-dimensionality in reciprocal herkogamy

Based on the analyses performed, it was observed that the upper organs (long-styled stigma vs. short-styled anthers) tend to be distributed mainly around 0° and 180° , with an average angle close to 90° for both organs (Fig 4A). In addition to the angulation, the anthers showed an average displacement of approximately 2 mm from the center, while the stigmas were located around 1.6 mm from the center (Fig 4A).

The lower organs (Fig 4B) showed that the stigmas of the short-styled morph were more concentrated near the center of the corolla, with most positioned within 1.5 mm of the central point. The anthers of the long-styled morph were also highly concentrated near the center, with a displacement of up to 0.5 mm. In this case, there was no preferential concentration on the upper or lower faces, as the organs were distributed along the full 360° (Fig 4B).

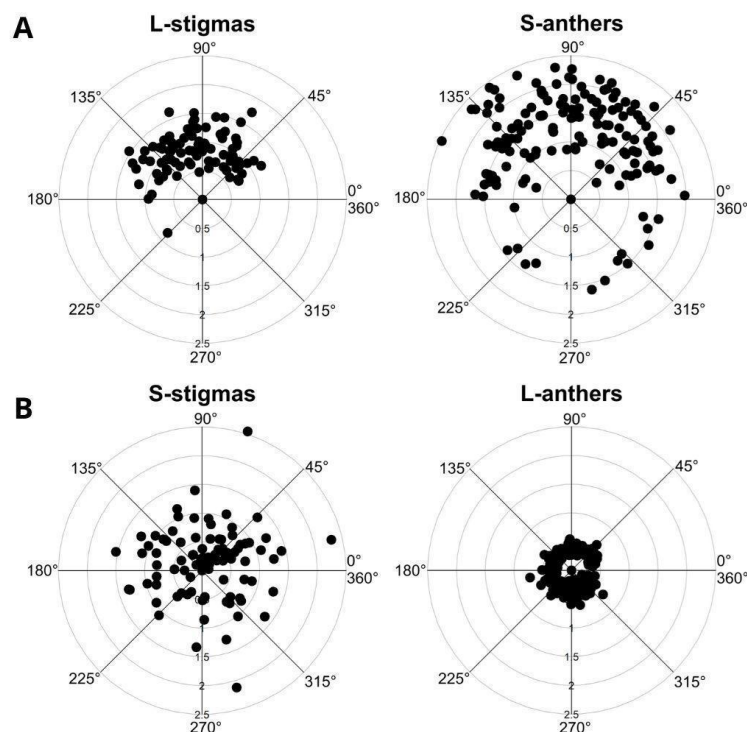


Figure 4. Circular graph showing the positioning of upper organs (A) (long-styled stigmas and short-styled anthers) and lower organs (B) (short-styled stigmas and long-styled anthers). Measurements were based on the displacement from

the center of the corolla (0 to 2.5 mm) and angle (0° to 360°). Black dots represent the points where measurements were taken: three points for each stigma (center and edges) and one point per anther, totaling five anthers per flower.

Table 1. Morphometrics of *Palicourea rigida* flowers for calculation of inaccuracy: mean ($\pm$ variance) of stigmas and anthers in short- and long-styled flowers. Negative horizontal distance values indicate that the organ is positioned to the left of the floral center, and positive values to the right. Negative values of the vertical distance indicate that the organ is positioned below the floral center and positive values above.

Floral morph	Measurements (mm)	
Sexual organs	Horizontal distance	Vertical distance
S-morph		
Anthers	0.04 (1.00)	0.98 (0.66)
Stigmas	0.08 (0.45)	0.14 (0.37)
L-morph		
Anthers	0.02 (0.08)	0.01 (0.09)
Stigmas	-0.12 (0.33)	0.77 (0.16)

Table 2. The inaccuracies of the high and low organ types are further decomposed into maladaptive bias² (the square of the departure of the trait mean from the optimum) and imprecision (= variance of the anthers and stigmas), and these two components sum to the inaccuracy of each respective organ type.

Organ type	Horizontal distance			Vertical distance			Total inaccuracy
	Maladaptive bias	Imprecision	Inaccuracy	Maladaptive bias	Imprecision	Inaccuracy	
High organs	0.03	1.33	1.35	0.04	0.81	0.86	2.21
Lower organs	0.00	0.52	0.53	0.02	0.47	0.48	1.01

The positioning data of sexual organs in *P. rigida* revealed distinct patterns between upper and lower organs. Short-styled anthers were concentrated on the upper side of the flower, positioned at an average of 0.98 ± 0.66 mm from the center on the vertical axis and 0.04 ± 1.00 mm on the horizontal axis. In the same morph, stigmas were located closer to the center of the flower, at 0.14 ± 0.37 mm on the vertical axis and 0.08 ± 0.45 mm on the horizontal axis (Table 1). In long-styled flowers, stigmas were located on the upper side, with an average of 0.77 ± 0.16 mm on the vertical axis and -0.12 ± 0.33 mm on the horizontal axis, while anthers remained close to the center, at 0.01 ± 0.09 mm on the vertical axis and 0.02 ± 0.08 mm on the horizontal axis (Table 1). In both morphs, the vertical displacement of sexual organs from the floral center was greater than the horizontal

displacement. Upper organs exhibited a higher maladaptive bias and imprecision than lower organs (for both horizontal and vertical displacement), indicating a greater deviation between the means of upper anthers and stigmas, as well as greater variation in their positioning (Table 2). Lower organs had more similar mean positions and lower variation (Table 2). Consequently, the total inaccuracy of upper organs (2.21) was more than twice that observed in lower organs (1.01) (Table 2), indicating that lower organs are more reciprocal than upper ones. Short-styled anthers showed the greatest variability in horizontal position (1.00 mm), followed by long-styled stigmas (0.33 mm), indicating greater lateral dispersion of these organs in relation to the center of the corolla (Table 1).

Pollen deposition on the body of pollinators

There was a significant effect of floral morph on the number of pollen grains deposited on the hummingbird's bill (Table 3), with the short-styled morph (mean $\pm$ standard deviation: 308.3 ± 208.0) depositing more pollen grains than the long-styled morph (20.48 ± 23.72). The region of the bill also had a significant effect (Table 3), with greater pollen deposition on the dorsal side compared to the ventral side (111.3 ± 126.9). The interaction between floral morph and bill region was statistically significant (Table 3), indicating that the pattern of pollen deposition on the hummingbird's body varies between morphs. Short-styled pollen was mostly deposited on the dorsal side of the bill, whereas long-styled pollen was deposited equally on both dorsal and ventral sides (Fig 5A).

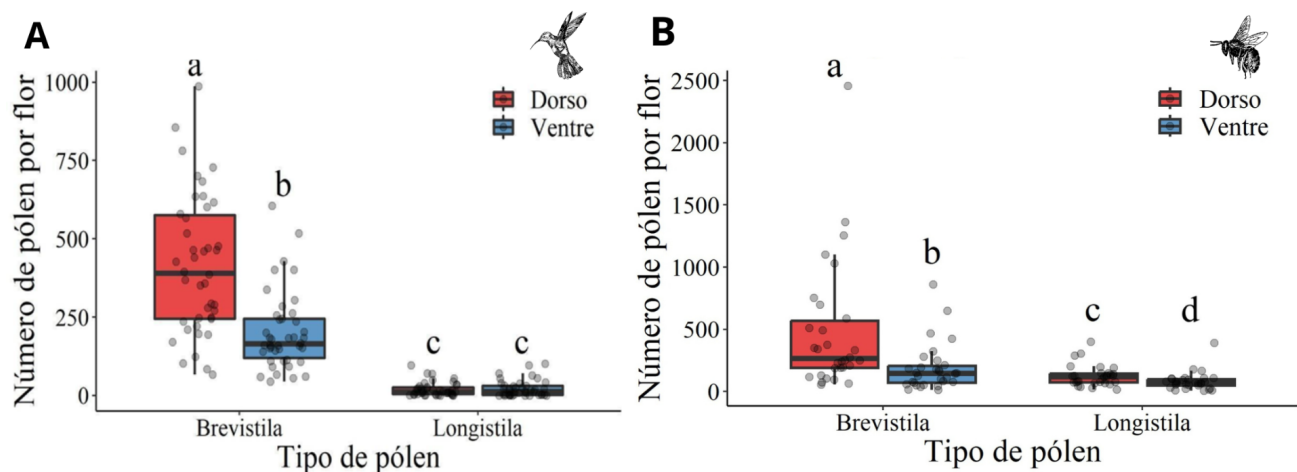


Figure 5. Amount of pollen from the short-styled and long-styled morphs of *Palicourea rigida* (Rubiaceae) deposited on the dorsal and ventral sides of the bill of the hummingbird *Eupetomena macroura* (A) and on the body of the bee *Epicharis flava* after the simulated visits. Different letters indicate significantly different amounts of pollen grains deposited on the hummingbird or the bee ($P < 0.05$).

Table 3. Results of the analysis of variance testing the effects of floral morph (short-styled and long-styled), surface of the bill/body, and their interaction on the number of *Palicourea rigida* (Rubiaceae) pollen grains deposited on the body of the hummingbird *Eupetomena macroura* and the bee *Epicharis flava*.

Hummingbird bill pollen deposition	<i>df</i>	χ^2	P
Pollen morph	1	18601.4	< 0.01
Bill region	1	3183.6	< 0.01
Bill region $\times$ pollen morph	1	257.5	< 0.01
Bee pollen deposition	<i>df</i>	χ^2	P
Pollen morph	1	6543.0	< 0.001
Body region	1	3815.0	< 0.001
Body region $\times$ pollen morph	1	245.0	< 0.001

There was also a statistically significant effect of floral morph, body region, and their interaction on the amount of pollen deposited on the bee body (Table 3). Short-styled pollen was found in greater amounts (544.39 ± 526.80) compared to long-styled (108.14 ± 69.42). The body region with the highest pollen deposition was the dorsal side (506.08 ± 568.39) compared to the ventral side (198.80 ± 204.64). Within-morph comparisons showed that both morphs deposit more pollen on the dorsal side of the bee than on the ventral side (Fig 4B). However, there was a greater deposition of short-styled than long-styled pollen on the dorsal side of the bees, and this pattern was also observed on the ventral side, with more short-styled than long-styled pollen (Fig 4B).

DISCUSSION

This study investigated potential three-dimensionality in reciprocal herkogamy, demonstrated the functional role of aggregated anther presentation in the short-styled morph and the displacement of the long-styled stigma, and explored how these traits affect pollen flow mediated by hummingbirds and bees in flowers of *P. rigida*. As proposed in the first and second hypotheses, the aggregated presentation of anthers in the short-styled morph results in pollen grains being deposited differently than the anthers of the long-styled morph, with a greater volume deposited on the dorsal region of the visitor's body (Fig 5). Complementarily, the long-styled is positioned corresponding to the location of the short-styled anthers; therefore, the aggregation combined with stigma displacement generates a 3D reciprocal herkogamy (RH) between these organs, specifically the high-level organs (Fig 4). Although 3D RH is characterized only in the high organs, no imbalance in inter-morph

pollen flow was found, as both high and low organs receive a higher load of legitimate pollen, despite the low organs receiving a greater volume due to their higher reciprocity (Raupp et al., 2020). No deviation in sexual function of the morphs was detected either, since *P. rigida* populations maintain a 1:1 morph ratio (Machado et al., 2010).

The manifestation of three-dimensionality only in the high organs can be considered a strategy to mitigate the lower reciprocity and reduced precision in pollen deposition on the pollinator's body, thereby avoiding asymmetry in pollen flow (Armbruster et al., 2006; Sá et al., 2016; Furtado et al., 2021, 2023). It is indeed true that as the hummingbird or bee collects floral resources in the short-styled flower, in the case of nectar in *P. rigida* (Machado et al., 2010), the contact of the anther with the visitor ends up spreading pollen along the dorsal region of the body, similarly to what occurs with the stigma of the long-styled morph, which comes into contact with this pollen band. Thus, this three-dimensional herkogamic adjustment of the high organs (3D HR) would provide an additional mechanical aid to achieve a less asymmetric inter-morph pollen flow. Moreover, it is important to consider that *P. rigida* flowers can be visited by both hummingbirds and bees, with short-styled pollen grains deposited differently among visitors, possibly due to differences in visitor size, body ornamentation, and/or behavior during visits.

The 3D herkogamy (3D HR) concept provides a more detailed perspective on the positioning of floral reproductive structures, and is not considered a new floral system. Thus, it is possible that many species do exhibit three-dimensionality of the organs, but studies have not taken this into account. Until now, the concept of 3D HR has been proposed in three genera: *Linnum suffruticosum* (Armbruster et al., 2006), *Turnera subulata* (Rech et al., 2020), and *Oxalis* (Turketti et al., 2012); however, the arrangement of reproductive organs in these species, unlike in *P. rigida*, is repeated in both morphs. Moreover, until now, 3D HR had never been reported in a species with a tubular corolla, since it was believed that only two-dimensional reciprocity would be sufficient to mediate legitimate pollen flow, and that the spatial limitation of a narrow tube would preclude a third dimension in organ organization (Armbruster et al., 2006). Therefore, we introduced this morphological conception for *P. rigida*, as a model of heterostylous angiosperm with tubular corolla, mainly due to the aggregated presentation of the short-styled anthers and the displacement of the long-styled stigma. Several studies on distylous species, many involving *Palicourea* and *Psychotria*, report greater imprecision in reciprocity among the high organs (Armbruster et al., 2006; Sá et al., 2016; Raupp et al., 2020; Furtado et al., 2021), as well as lower precision in pollen deposition on the pollinator's body by the short-styled anthers (Armbruster et al., 2006). We

therefore suggest that three-dimensionality among the high organs is a compensatory mechanism to avoid asymmetry in pollen flow (Armbruster et al., 2006; Sá et al., 2016; Furtado et al., 2021, 2023). Furthermore, it is important to note that besides the greater reciprocity of the low organs, particularly in distylous species of Rubiaceae, the stigmatic lobes of short-styled flowers tend to be significantly larger than those of the long-styled morph and are more likely to receive a compatible higher pollen load (Machado et al., 2010; Furtado et al., 2021), which further justifies the need for additional mechanical complementation in pollen flow among the high organs.

The aggregated presentation of the anthers is the morphological arrangement that constitutes the three-dimensionality of the high organs, as previously mentioned, an uncommon characteristic in *Palicourea* and in Rubiaceae (Matias et al., 2016). What is known in the literature for Rubiaceae are reports of three species that exhibit the same aggregated presentation of stamens and possible inferences about their functionality, such as studies with *Palicourea deflexa* (Matias et al., 2016), then classified in the genus *Psychotria*, *P. nitidula* (Furtado, 2015), and a recent study with *Palicourea rigida* itself (Raupp et al., 2020). In none of these works was three-dimensionality investigated, so in a complex system like distyly, the role of pollinators in pollen flow becomes an even more fundamental part of this mechanism. A study conducted with the same population of *P. rigida* (Furtado et al., 2023) demonstrated that among the two main pollinator groups there is a difference in efficiency and pollinator behavior between the morphs, with hummingbirds being more efficient in legitimate pollen flow among the low organs, while bees are more efficient in the flow among the high organs, those most affected by the three-dimensional positioning. Although we believe that three-dimensionality may be a compensatory measure for the lower level of reciprocity among high organs, the possibility that anther aggregation is also a strategy to reduce the rate of sexual self-interference in the short-styled morph cannot be discarded. Due to the greater body complexity of a bee compared to the bill of a hummingbird, since bees have structures such as scopae, antennae, body segments etc. bees would have more chances to self-pollinate a short-styled flower because the anthers are arranged just above the stigma, especially in a stigma with long lobes (Furtado et al., 2023). As a bee enters the corolla to access nectar, the anthers presented circularly at the corolla entrance would allow pollen to be easily pushed onto the stigma located just below (Darwin, 1977). Therefore, the aggregated presentation of the anthers would be a way to clear the pathway for the bee's entry and, consequently, reduce rates of sexual self-interference. Not coincidentally, the other two Rubiaceae species with the same anther architecture are also pollinated by bees (Matias et al., 2016; Furtado, 2015).

Wesselingh et al., (2000), while studying three different floral species with similar morphology (epipetalous and tubular) visited by the bee *Bombus ephippiatus*, demonstrated that in *Palicourea brenesii* pollen deposition by the anthers of short-styled flowers occurs more efficiently on bees compared to deposition by the anthers of long-styled flowers. This result highlights the importance of the precise positioning of anthers in the effectiveness of pollen transfer during interactions with bees. Similarly, *Primula sieboldii* shows greater efficiency in pollen flow through the high sexual organs when visited by *Bombus diversus*. In this case, the more external positioning of the organs favored pollen deposition along the head and proboscis of the bee, since the relatively narrow corolla presented an obstacle to the insertion of the bee's organs (Nishihiro et al., 2000). Both studies emphasized how the spatial arrangement of reproductive organs in tubular flowers directly influences the efficiency of pollination by bees, a pattern also reflected in the floral characteristics observed in *P. rigida*. This pattern suggests a possible specialization between floral morphs and their respective pollinators related to the position of reproductive organs and the structural features of the flower. The high organs, which present 3D herkogamy, appear to be more associated with pollination by bees, while the low organs, inserted within the tubular and narrow corolla, favor pollination by hummingbirds. The floral morphology of *P. rigida*, with a long and narrow corolla, represents a barrier to bee access to the low reproductive organs but is highly compatible with pollination by hummingbirds. This pattern has been demonstrated experimentally in manipulations with species of *Penstemon* (Plantaginaceae), in which corolla narrowing, absence of a landing platform, and the pendulous positioning of flowers discouraged bee visits but favored pollen flow promoted by hummingbirds (Castellanos et al., 2003; Salas-Arcos et al., 2018).

The aggregated presentation of stamens in the short-styled morphs of *P. rigida* may represent an advantage in interactions with bees, as demonstrated by Thompson et al., (2003). Their study showed that in bee-visited plants, pollen donation occurs in larger volumes because these insects also use pollen as a food resource. Since much of the pollen collected by bees is stored on their bodies and does not reach the stigma, the efficiency of pollen flow between flowers may depend on the release of a larger pollen load. Perhaps for this reason, short-styled pollen in *P. rigida* appears in greater quantities compared to long-styled pollen on both sides of the pollinators' bodies. Delivering a larger pollen load in flowers with aggregated anthers is common (Ren, 2008), as their proximity results in depositing a concentrated mass of pollen on pollinators, unlike flowers with non-aggregated anthers that release pollen less concentrated. Moreover, this more voluminous and concentrated deposition stimulates greater spreading of pollen grains over the entire body, which may explain the higher rate of illegitimate pollination in the short-styled morph, regardless of

pollinator type (Raupp et al., 2020). However, when it comes to hummingbird pollination, studies indicate that a significantly greater amount of long-styled pollen is deposited on the stigmas of short-styled flowers when hummingbirds act as pollinators (Furtado et al., 2023). Despite having a more simplified body structure than bees, hummingbirds promote efficient pollen flow in the low organs, as their morphology favors more direct and precise contact with these structures. This reciprocity pattern is more evident in the low organs than in the high ones, which may justify the existence of 3D herkogamy in the high organs (Raupp et al., 2020).

Another relevant factor defined from observations is that, although the filaments of the short-styled anthers are epipetalous and the style of the long-styled stigma has terminal insertion, the tips of these organs do not remain rigidly positioned along this axis but rather lean toward the upper face of the flower. Furthermore, the long-styled stigma appears to have a more uniform positioning, with less data dispersion, which may facilitate pollen deposition during pollinator visits (Fig 4). On the other hand, the short-styled anthers seem to occupy a larger area of the corolla, maximizing the pollen dispersal area, thereby facilitating contact with the pollinator and consequently the transfer of pollen to the opposite stigma. This arrangement suggests a certain degree of reciprocity beyond height, occurring in three dimensions, enhancing pollen flow (Fig 4). The combined data analysis suggests that *P. rigida* exhibits 3D herkogamy of the high organs, with greater positional variability and angulation directed toward the upper face of the corolla. Meanwhile, the low organs have a more stable and precise positioning. This tridimensionality in the high organs may be related to a greater imprecision in positioning, emerging as a factor to balance pollen flow in the more inaccurate organs compared to the highly reciprocal low organs.

Our results corroborate previous studies demonstrating that pollen deposition on pollinators' bodies varies according to the positioning of the anthers in the morphs. This pattern of anther aggregation and displacement appears to have considerable functional relevance, particularly as it indicates a strategy to optimize contact with pollinators, as also observed in other species with aggregated stamen structures (Ren, 2008). In such cases, the arrangement of anthers tends to facilitate pollen placement on visitors and reduce the risk of self-pollination, while allowing functional space within the flower for pollinator movement (Yang et al., 2004). Furthermore, our results provide a new perspective on the relationship between morphs and pollinators, indicating that bees can be more associated with the high organs exhibiting 3D herkogamy, whereas hummingbirds favor pollen flow on the low, more reciprocal organs. On the other hand, this study highlights a novel aspect by analyzing how deposition differs relative to the complexity of the visitor's body structure

(hummingbird versus bee), demonstrating that, to some extent, simpler structures without recesses or hairs may contribute to more symmetrical deposition, with the dorsum receiving more short-styled pollen and the ventral side receiving pollen from both morphs, as found on the hummingbird's bill.

REFERENCES

- Anderson, W.R., 1973. A morphological hypothesis for the origin of heterostyly in the Rubiaceae. *Taxon* 22(5–6), 537–542. <https://doi.org/10.2307/1218628>
- Armbruster, W.S., Péres-Barrales, R., Arroyo, J., Edwards, M.E., Pablo, V., 2006. Three-dimensional reciprocity of floral morphs in wild flax (*Linum suffruticosum*): a new twist on heterostyly. *New Phytol.* 171(3), 581–590. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01749.x>
- Armbruster, W.S., Bolstad, G.H., Hansen, T.F., Keller, B., Conti, E., Pélabon, C., 2017. The measure and mismeasure of reciprocity in heterostylous flowers. *New Phytol.* 215, 906–917.
- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., Walker, S., 2015. Fitting linear mixed-effects models using lme4. *J. Stat. Softw.* 67, 1–48. <https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01>
- Braga, B.L.P., Matias, R., Consolaro, H., Souza, J.T., Almeida, N.M., 2022. Inaccuracy of sexual organ position and spatial variation of styles in monomorphic enantiostylous flowers of *Senna rugosa* (Fabaceae–Caesalpinioideae). *Flora* 293, 152112. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2022.152112>
- Castellanos, M.C., Wilson, P., Thomson, J.D., 2003. Pollen transfer by hummingbirds and bumblebees, and the divergence of pollination modes in *Penstemon*. *Evolution* 57, 2742–2752. <http://www.jstor.org/stable/3448727>
- Consolaro, H., Toledo, R.D.C.P., Ferreguti, R.L., Hay, J., Oliveira, P.E., 2009. Distyly and homostyly in four *Palicourea* Aubl. (Rubiaceae) species from the Cerrado of Central Brazil. *Braz. J. Bot.* 32, 655–667. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042009000400004>
- Darwin, C., 1877. The different forms of flowers on plants of the same species. John Murray, London.

- Feinsinger, P., Busby, W.H., 1987. Pollen carryover: experimental comparisons between morphs of *Palicourea lasiorrachis* (Rubiaceae), a distylous, bird-pollinated, tropical treelet. *Oecologia* 73, 231–235. <https://doi.org/10.1007/BF00377512>
- Fenster, C.B., Armbruster, W.S., Wilson, P., Dudash, M.R., Thomson, J.D., 2004. Pollination syndromes and floral specialization. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 35, 375–403. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132347>
- Fetscher, A.E., 2001. Resolution of male–female conflict in an hermaphroditic flower. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 268, 525–529.
- Fetscher, A.E., Kohn, J.R., 1999. Stigma behavior in *Mimulus aurantiacus* (Scrophulariaceae). *Am. J. Bot.* 86, 1130–1135.
- Fishbein, M., Venable, D.L., 1996. Diversity and temporal change in the effective pollinators of *Asclepias tuberosa*. *Ecology* 77, 1061–1073. <https://doi.org/10.2307/2265576>
- Fox, J., Weisberg, S., 2019. *An R Companion to Applied Regression*, 3rd ed. Sage, Thousand Oaks, CA.
- Freeman, D.C., Doust, L., El-Keblawy, A., Miglia, K.J., McArthur, E.D., 1997. Sexual specialization and inbreeding avoidance in the evolution of dioecy. *Bot. Rev.* 63, 65–92. <https://doi.org/10.1007/BF02858506>
- Furtado, M.T., Matias, R., Pérez-Barrales, R., Consolaro, H., 2023. Complementary roles of hummingbirds and bees: Pollen pickup, pollen deposition, and fruit production in the distylous *Palicourea rigida*. *Am. J. Bot.* e16194.
- Furtado, M.T., Matias, R., Pérez-Barrales, R., Consolaro, H., 2021. Do reciprocal herkogamy and pollinators affect the legitimate pollen flow in distylous species? *Bot. J. Linn. Soc.* 196(4), 524–539. <https://doi.org/10.1093/botlinnean/boab004>
- Furtado, M.T.R., 2015. A funcionalidade da distília em *Psychotria nitidula* Cham. & Schltdl. (Rubiaceae): o papel do polinizador na transferência de pólen. M.Sc. Thesis. Universidade de Brasília, Brasília.
- Ganders, F.R., 1979. The biology of heterostyly. *N. Z. J. Bot.* 17, 607–635.

- García-Robledo, C., 2008. Asymmetry in pollen flow promotes gender specialization in morphs of the distylous neotropical herb *Arcytophyllum lavarum* (Rubiaceae). *Evol. Ecol.* 22, 743–755.
- González, C., Ornelas, J.F., Jiménez, L., 2005. Between-year changes in functional gender expression of *Palicourea padifolia* (Rubiaceae), a distylous, hummingbird-pollinated shrub. *Ann. Bot.* 95, 371–378. <https://doi.org/10.1093/aob/mci026>
- Hamilton, C.W., 1990. Variations on a distylous theme in mesoamerican *Psychotria* subgenus *Psychotria* (Rubiaceae). *Mem. N. Y. Bot. Gard.* 55, 62–75.
- Harder, L.D., Barrett, S.C.H., Cole, W.W., 1993. Pollen removal from tristylous *Pontederia cordata*: effects of anther position and pollinator specialization. *Ecology* 74(4), 1059–1072. <https://doi.org/10.2307/1940476>
- Käfer, J., Marais, G.A., Pannell, J.R., 2017. On the rarity of dioecy in flowering plants. *Mol. Ecol.* 26(5), 1225–1241. <https://doi.org/10.1111/mec.14020>
- Köppen, W., 1948. *Climatología: un estudio de los climas de la Tierra*. Fondo de Cultura Económica, México.
- Lau, P., Bosque, C., 2003. Pollen flow in the distylous *Palicourea fendleri* (Rubiaceae): an experimental test of the disassortative pollen flow hypothesis. *Oecologia* 135, 593–600. <https://doi.org/10.1007/s00442-003-1216-5>
- Lenth, R.V., 2019. emmeans: Estimated marginal means, aka least-squares means. *R package version 1.4.1*. <https://CRAN.R-project.org/package=emmeans>
- Lloyd, D.G., Webb, C.J., 1992. The evolution of heterostyly. In: Barrett, S.C.H. (Ed.), *Evolution and Function of Heterostyly*. Springer, Berlin, pp. 151–178.
- Machado, A.O., Silva, A.P., Consolaro, H., Barros, M.A.G., Oliveira, P.E., 2010. Breeding biology and distyly in *Palicourea rigida* H.B. & K. (Rubiaceae) in the Cerrados of Central Brazil. *Acta Bot. Bras.* 24(3), 686–696. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062010000300012>
- Matias, R., Oliveira, A.S., Furtado, M.T., Sá, T., Rodrigues, E.B., Oliveira, P.E., Consolaro, H.N., 2016. Sistema reprodutivo atípico de duas espécies de Rubiaceae: distília com autoincompatibilidade parcial no morfo brevistilo? *Rodriguésia* 67(2), 357–368. <https://doi.org/10.1590/2175-7860201667207>

- Matias, R., Furtado, M.T., Consolaro, H., Pérez-Barrales, R., 2021. Variation in pollen sterility and gender specialization: an investigation with distylous species of *Erythroxylum* (Erythroxylaceae). *Plant Biol.* 23, 947–955. <https://doi.org/10.1111/plb.13310>
- Nicholls, M.S., 1986. Population composition, gender specialization, and the adaptive significance of distyly in *Linum perenne* (Linaceae). *New Phytol.* 102, 209–217. <http://www.jstor.org/stable/2484994>
- Nicholls, M.S., 1987. Pollen flow, self-pollination and gender specialization: factors affecting seed-set in the tristylous species *Lythrum salicaria* (Lythraceae). *Pl. Syst. Evol.* 156(3–4), 151–157. <https://doi.org/10.1007/BF00936070>
- Nishihiro, J., Washitani, I., Thomson, J.D., Thomson, B.A., 2000. Patterns and consequences of stigma height variation in a natural population of a distylous plant, *Primula sieboldii*. *Funct. Ecol.* 14, 502–512. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2435.2000.00449.x>
- R Core Team, 2025. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Raupp, P.P., Matias, R., Furtado, M.T., Consolaro, H., 2020. The role of distyly in pollen flow of the hummingbird pollinated *Palicourea rigida* (Rubiaceae). *Flora* 271, 151681. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2020.151681>
- Rech, A.R., Achkar, M.T., Jorge, L.R., Armbruster, W.S., Almeida, O.J.G., 2020. The functional roles of 3D heterostyly and floral visitors in the reproductive biology of *Turnera subulata* (Turneroideae: Passifloraceae). *Flora* 264, 151559. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2020.151559>
- Ren, M.X., 2008. Stamen fusion in plants: diversity, adaptive significance, and taxonomic implications. *J. Syst. Evol.* 46(6), 761–771. <https://doi.org/10.3724/SP.J.1002.2008.06184>
- Rodrigues, E.B., Consolaro, H., Pérez-Barrales, R., Oliveira, P.E., 2022. Evolution of distyly breakdown in Palicoureeae Robbr. & Manen and Psychotrieae Cham. & Schltdl. (Rubiaceae). *Acta Bot. Bras.* 36, e2021abb0242. <https://doi.org/10.1590/0102-33062021abb0242>
- Roquer-Beni, L., Arnan, X., Rodrigo, A., Bosch, J., 2022. What makes a good pollinator? Relationship between pollinator traits and pollination effectiveness in apple flowers. *Entomol. Gen.* 42, 875–882. <https://doi.org/10.1127/entomologia/2022/1571>

- Sá, T., Furtado, M.T., Ferrero, V., Pérez-Barrales, R., Rodrigues, E., Santos, I.S., Consolaro, H., 2016. Floral biology, reciprocal herkogamy and breeding system in four *Psychotria* species (Rubiaceae) in Brazil. *Bot. J. Linn. Soc.* 182, 731–746. <https://doi.org/10.1111/boj.12476>
- Salas-Arcos, L.C., Lara, C., Castillo-Guevara, C., Cuautle, M., Ornelas, J.F., 2018. Pro-bird floral traits discourage bumblebee visits to *Penstemon gentianoides* (Plantaginaceae), a mixed-pollinated herb. *Naturwissenschaften* 106, 1–9. <https://doi.org/10.1007/s00114-018-1595-4>
- Silva, A.P., 1995. Biologia reprodutiva e polinização de *Palicourea rigida* H.B.K. (Rubiaceae). Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, Brasília.
- Stone, L., Thomson, J.D., 1994. The evolution of distyly: pollen transfer in artificial flowers. *Evolution* 48, 1595–1606. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1994.tb02198.x>
- Thomson, J.D., 2003. Pollen removal and deposition by honeybee and bumblebee visitors to apple and almond flowers. *J. Appl. Ecol.* 38, 1032–1044. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2664.2001.00684.x>
- Turketti, S.S., Esler, K.J., Dreyer, L.L., 2012. Three-dimensional reciprocity: a new form of tristily in South African *Oxalis* (Oxalidaceae) species and its implications for reproduction. *S. Afr. J. Bot.* 78, 195–202. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2011.06.014>
- Valois-Cuesta, H., Soriano, P.J., Ornelas, J.F., 2012. Gender specialization in *Palicourea demissa* (Rubiaceae), a distylous, hummingbird-pollinated treelet. *Pl. Syst. Evol.* 298(5), 975–984. <https://doi.org/10.1007/s00606-012-0607-7>
- Vieira, D.L.M., Coutinho, A.G., Rocha, G.P.E., 2012. Resprouting ability of dry forest tree species after disturbance does not relate to propagation possibility by stem and root cuttings. *Restor. Ecol.* 21, 305–311.
- Waser, N.M., 1993. Population structure, optimal outbreeding, and assortative mating in angiosperms. In: Thornhill, N.W. (Ed.), *The Natural History of Inbreeding and Outbreeding: Theoretical and Empirical Perspectives*. University of Chicago Press, Chicago, pp. 173–199.
- Wesselingh, R.A., Burgers, H.C.M., Den Nijs, H.C.M., 2000. Bumblebee pollination of understory shrub species in a tropical montane forest in Costa Rica. *J. Trop. Ecol.* 16(5), 657–672. <https://www.jstor.org/stable/3068678>

Willmer, P.G., Cunnold, H., Ballantyne, G., 2017. Insights from measuring pollen deposition: quantifying the pre-eminence of bees as flower visitors and effective pollinators. *Arthropod-Plant Interactions* 11, 411–425. <https://doi.org/10.1007/s11829-017-9528-2>SpringerLink+2

Yang, S.X., Yang, C.F., Zhang, T., Wang, Q.F., 2004. A mechanism facilitates pollination due to stigma behavior in *Campsis radicans* (Bignoniaceae). *Acta Bot. Sin.* 46, 626–630.