

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 03/06/2022.

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA VEGETAL)**

**FENOLOGIA, ECOLOGIA REPRODUTIVA E RAZÃO SEXUAL DE *Zamia boliviana*
(Brongn.) A. DC. (CYCADALES, ZAMIACEAE): UMA CICADA TROPICAL RARA E
AMEAÇADA**

ROSANE SEGALLA SOARES

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutora em Ciências Biológicas, ênfase em Biologia Vegetal

JUNHO - 2020

ROSANE SEGALLA SOARES

**FENOLOGIA, ECOLOGIA REPRODUTIVA E RAZÃO SEXUAL DE *Zamia boliviana*
(Brongn.) A. DC. (CYCADALES, ZAMIACEAE): UMA CICADA TROPICAL RARA E
AMEAÇADA**

Orientadora: Profa. Dra. LEONOR PATRÍCIA CERDEIRA MORELLATO

Coorientador: Prof. Dr. FÁBIO PINHEIRO

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências do Câmpus de Rio
Claro, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos
para obtenção do título de doutora
em Ciências Biológicas, ênfase em
Biologia Vegetal

Rio Claro - SP

2020

S676f

Soares, Rosane Segalla

Fenologia, ecologia reprodutiva e razão sexual de *Zamia boliviana* (Brongn.) A. DC. (Cycadales, Zamiaceae): uma cicada tropical rara e ameaçada / Rosane Segalla Soares. -- Rio Claro, 2020

115 f. : il., tabs., fotos, mapas

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientadora: Leonor Patrícia Cerdeira Morellato

Coorientador: Fábio Pinheiro

1. Conservação de cicadáceas. 2. Interações ecológicas. 3. Sistema reprodutivo. 4. Tempo reprodutivo. 5. Custo de reprodução. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE : FENOLOGIA , ECOLOGIA REPRODUTIVA E RAZÃO SEXUAL DE ZAMIA BOLIVIANA (BRONGN .) A. DC. (CYCADALES , ZAMIACEAE): UMA CICADA TROPICAL RARA E AMEAÇADA

AUTORA: ROSANE SEGALLA SOARES

ORIENTADORA: LEONOR PATRÍCIA CERDEIRA MORELLATO

COORIENTADOR: FÁBIO PINHEIRO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA VEGETAL), área: Biologia Vegetal pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. LEONOR PATRÍCIA CERDEIRA MORELLATO 

Departamento de Botânica / UNESP - Instituto de Biociências de Rio Claro - SP

Prof. Dr. MICHAEL CALONJE 

Florida USA / Montgomery Botanical Center

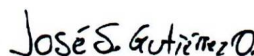
Prof. Dr. NICOLAY LEME DA CUNHA 

Grupo de Ecología de la Polinización INIBIOMA/ CONICET-Universidad Nacional dei Comahue, Rio Negro/Argentina

Prof. Dr. FRANCISCO DE ALMEIDA LOBO 

Faculdade de Agronomia e Zootecnia / Universidade Federal de Mato Grosso

Prof. Dr. JOSÉ SAID GUTIÉRREZ-ORTEGA Departamento de Biologia / Chiba University, Chiba, Japan



Rio Claro, 03 de junho de 2020

DEDICATÓRIA

To the most learned and distinguished Cycad Scientists;
To the youngest Cycad Biologists;
To the Lovers and Cycad Guardians;
I dedicate.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso (IFMT) e em nome do senhor reitor Willian Silva de Paula estendo meus agradecimentos às equipes diretivas de pró-reitorias e do Campus Cáceres Prof. Olegário Baldo, pelos encaminhamentos vinculados ao processo de Licença Pós-Graduação e outras providências a mim concedidas.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, Processo #2013/50155-0.

Em nome do coordenador Douglas Silva Domingues agradeço ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biologia Vegetal) e estendo meus agradecimentos aos servidores e colaboradores das equipes diretivas do Departamento de Biodiversidade da Unesp de Rio Claro, pelo apoio logístico e burocrático recebido.

Thank you Cycad Specialist Group Members, Colombian Cycad Society, Cycad Society of South Africa, especially, Wynand Van Eeden and Montgomery Botanical Center for all the support I received.

Aos orientadores, Leonor Patrícia Cerdeira Morellato pela confiança e apoio a mim concedidos, desde as necessidades primordiais. A Fábio Pinheiro pela serenidade e benevolência no decorrer dos trabalhos.

A comissão examinadora desta tese, pela disponibilidade e dedicação, muito obrigada!

Aos proprietários de terras que guardam populações de *Z. boliviana* e me permitiram acessá-las e desenvolver os trabalhos de pesquisa, minha terna gratidão. Meu especial agradecimento à família do Osvaldo e Evanil, pelo abrigo, suporte e todos os cuidados a mim dedicados.

Gentilmente agradeço a Eduardo Guimarães Couto da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT) e a Juberto Babilônia de Souza (IFMT), pelo apoio no estudo de solos. Cordiais agradecimentos a Fernando Zagury Vaz-de-Mello e equipe do Laboratório de Scarabaeoidologia (UFMT), pelo auxílio e acesso às instalações e equipamentos do laboratório. Aos servidores do Herbário UFMT Cuiabá, pelo suporte com as amostras de material vegetal. Aos estudantes João Basso Marques e Lucas Rothmund do Programa de Pós-Graduação em Física Ambiental (UFMT) pela gentil colaboração nas tentativas com alguns experimentos. Igualmente, agradeço a Pedro V. Eisenlohr e equipe do Laboratório de Ecologia (UNEMAT,

Alta Floresta), pela oportunidade e vivência científica-ecológica. Aos colegas do Laboratório de Fenologia (Departamento de Biodiversidade, Unesp, Rio Claro) e demais estudantes, pesquisadores, amadores e anônimos das instituições do Brasil e fora dele que colaboraram, de algum modo, na realização dos trabalhos da tese. Meus sinceros agradecimentos.

Aos fiéis escudeiros: Sebastião Luiz Mendes de Souza (Tico), pelo companheirismo, cuidados e eficiência nos serviços de campo. A Caetano Carlos Falone, Maria Hunter, Fernando Vieira, Francismeire Jane Telles, Gudryan B. Barônio, Joanna M. Tucker Lima, Natalia Costa Soares, Simone Rechmann pelos auxílios, incentivos e sábias discussões... meus ternos agradecimentos.

Sem olvidar, agradeço à minha família, familiares e amigos, pelos aprendizados moderno-contemporâneos, especialmente, ao amor incondicional dos guerreiros parciais Emerson e aguerrido aprendiz Davi#Vida.

A poesia manoelina – do saudoso Matogrossense Manoel de Barros – “As Bênçãos”, poderá reverdecer meu sentir, minha gratidão a todos que, de algum modo, estiveram comigo nas circunstâncias de “No descomeço era o verbo/. Só depois é que veio o delírio do verbo/”:

Não tenho a anatomia de uma *Eumaeus* pra receber
em mim os perfumes das flores e do azul.
Mas eu recebo.
É uma bênção.

Às vezes se tenho uma tristeza,
As *Cyanocorax* me namoram mais de perto.
Fico enamorada.
É uma bênção.

Logo dou as cícdas ornamentos de ouro
para que se tornem peregrinas do chão.
Elas se tornam.
É uma bênção.

Até alguém já chegou de me ver passar
a mão nos cabelos de Deus!
Eu só queria agradecer.

(Modificado de Barros, Manoel de. Poesia completa, São Paulo: Leya, 2013. p. 465).

EPÍGRAFE

"A amorosidade de que falo, o sonho pelo qual brigo e para cuja realização me preparo permanentemente, exigem em mim, na minha experiência social, outra qualidade: a coragem de lutar ao lado da coragem de amar!"

(Paulo Freire)

SUMMARY

Resumo Geral	11
General Abstract	13
Chapter 1. A review of current knowledge of Zamiaceae, with emphasis on <i>Zamia</i> from South America	15
Abstract.....	16
Introduction.....	16
Review method.....	17
The knowledge of Zamiaceae over time, research topic, species, and continents.....	17
Reproductive biology and ecological interactions on Zamiaceae.....	20
<i>Mutualistic Interactions: plant-pollinators</i>	23
<i>Mutualistic interactions: seed dispersers and consumers</i>	24
<i>Antagonist interactions: herbivores and seed predators</i>	24
<i>Biogeographic studies as a conservation strategy for <i>Zamia</i> species</i>	25
Challenges and perspectives, with emphasis on <i>Zamia</i> from South America.....	28
Concluding remarks.....	29
Supplemental material.....	30
References.....	30
Chapter 2. Phenology of a <i>Zamia</i> from seasonal biological Hotspot of South America	37
Background and Aims.....	38
Introduction.....	39
Material and methods.....	40
Results.....	43
Strobili's biology: Morphology, lifespan and growth dynamics.....	43
Frequency of reproductive cycles.....	48
Synchrony of phenological intensity and activity of the populations.....	48
Discussion.....	51
References.....	54
Supplementary material.....	58
Chapter 3. Male biased sex ratio across populations of <i>Zamia boliviana</i> (Zamiaceae)	66
Background and Aims.....	67
Introduction.....	68
Material and methods.....	69
Results.....	76

Sex ratio pattern.....	76
Habitat features.....	77
Sex ratio and its correlation with environmental factors.....	78
Discussion.....	80
Conclusions.....	83
References.....	84
Supplemental Material.....	88
Chapter 4. New report of <i>Eumaeus</i> (Lepidoptera: Lycaenidae) associated with <i>Zamia boliviana</i>, a cycad from Brazil and Bolivia.....	89
References.....	92
Chapter 5. Reproductive biology of a South American cycad involving brood-site pollination mutualism.....	93
Background and Aims	94
Introduction.....	95
Material and methods.....	96
Results.....	98
Insect visitors, behavior and efficiency of vectors in pollination.....	98
<i>Pollination vector exclusion tests</i>	98
<i>Visitors and their behavior in the strobili</i>	100
Discussion.....	105
Conclusions.....	108
References.....	108
General Conclusions.....	113

RESUMO GERAL – Cicadáceas são plantas que ocupam um lugar especial na botânica. A valoração biológica, social e cultural deriva do antigo registro fóssil, que remontam mais de 250 milhões de anos e dos atributos cênicos e harmônicos que elas representam. As cicadáceas são predominantemente dioicas, com cruzamentos e sincronismos fenológicos obrigatórios. A ausência desses mecanismos torna indivíduos efetivamente estéreis. No curso de sua evolução, tais plantas desenvolveram interações com agentes bióticos, algumas indissociáveis como os mutualismos envolvidos na polinização, os serviços de dispersão de sementes e os antagonismos, como a herbivoria. Nesta tese elegemos *Zamia boliviana*, uma cicadácea do Cerrado, para descrever a fenologia reprodutiva, a razão sexual e as interações mutualísticas e antagônicas de suas populações no ambiente natural. Avaliamos o desempenho reprodutivo, mostrado pelo padrão da vida útil de estróbilos e da análise do padrão fenológico e da razão sexual, bem como, a natureza das interações cicadácea-insetos. Discorremos sobre como podemos associar as descobertas ao entendimento e conservação deste sistema biológico, à luz do sucesso ancestral da planta e do regime dos ecossistemas contemporâneos em que se desenvolve. Argumentamos que as condições bioclimáticas do Cerrado e as interações bióticas envolvidas com a cicadácea, têm sido primordiais para sua sobrevivência. A abrangência de atributos funcionais desses habitats permite que essa espécie persista como "gimnospermas em meio à indubitável diversidade de angiospermas" tropicais (Forzza et al. 2010; BFG, 2015), em ecossistemas impulsionados por processos determinísticos, efeitos fundadores e estocásticos. Em uma revisão de literatura da família Zamiaceae (Capítulo I), descobrimos que o número de publicações dobrou no século XXI, concentrando-se principalmente em genética, taxonomia e sistemática, morfologia, interações ecológicas e um interesse crescente em ecologia e conservação populacional. Investigações sobre esses tópicos e estratégias de conservação, especialmente para espécies de *Zamia* na América do Sul, foram apontadas como necessárias. No estudo fenológico (Capítulo II), identificamos padrão reprodutivo sazonalmente sincrônico, com sobreposição predominante das fases de emergência, derramamento de pólen e receptividade dos estróbilos, igualmente compatíveis entre os sexos, populações e anos subsequentes. A vida útil dos estróbilos é semelhante a distinção morfológica e temporal típica de *Zamia* spp., com marcada diferença no desenvolvimento de estróbilos ovulíferos, em relação aos poliníferos. O estudo de razão sexual (Capítulo III), mostrou viés predominantemente masculino para a maioria das populações examinadas. Esse resultado foi atribuído, principalmente, aos custos diferenciais dos sexos. Interações antagônicas especializadas e obrigatórias são típicas das cicadáceas em todo o mundo, como as de *Eumaeus minyas* Hübn. (Lepidoptera: Lycaenidae) (Capítulo IV) e também foram registradas para *Z. boliviana*.

Observações periódicas em populações da cicadácea e a condução de experimentos no ambiente natural mostraram insetos visitantes (visitantes sazonais e oportunisticamente não confiáveis), seu comportamento e eficiência como vetores de polinização (Capítulo V). Os resultados evidenciaram que o vento não é necessário para a polinização dessa cicadácea. Por outro lado, revelamos a existência de mutualismo obrigatório e especializado envolvendo uma espécie de besouro e essa cicadácea, um mecanismo também conhecido para outras *Zamia* spp.. A cicadácea hospedeira é polinizada por uma nova espécie de *Pharaxonotha* (Coleoptera: Erotylidae), descrita no decorrer desta tese. *Pharaxonotha cerradensis* Skelley and Segalla mantém seu ciclo de vida em associação com as estruturas reprodutivas de *Z. boliviana* e a sazonalidade bioclimática do Cerrado. Provavelmente, a combinação de fatores físicos, químicos e biológicos (e. eg.: bioclimáticos, morfológicos, adaptativos, defensivos e interações) permitiu que essa e outras *Zamia* spp. tenham sobrevivido a outras plantas sub-históricas. Nossa pesquisa mostra e corrobora estudos anteriores sobre a biologia e ecologia de *Zamia* spp. e aponta para a necessidade de pesquisas com espécies dioicas e suas interações na América do Sul. Esse conhecimento é fundamental para entender e conservar sistemas biológicos co-dependentes de espécies endêmicas, raras e de vida longa, como as linhagens relíquias e ecologicamente restritas de *Zamia* spp..

Palavras-chave: Conservação de cicadáceas, Ciclo de vida de besouros, Interações ecológicas, Herbívoros obrigatórios, Plantas hospedeiras, Tempo reprodutivo, Sistema reprodutivo, Viés sexual, Custo de reprodução, Vida útil de estróbilos

GENERAL ABSTRACT – Cycads are plants that occupy a special place in botany. The biological, social and cultural relevance derive from the ancient fossil record, which dates back more than 250 million years and the scenic and harmonic attributes that represent. Cycads are predominantly dioecious, with obligate outcrossing and phenological synchronism. In the absence of such mechanisms, individuals become effectively sterile. During their evolution, cycads have developed interactions with biotic agents, including some inextricable relationships such as mutualisms involved in pollination, seed dispersal services and antagonisms, such as herbivory. In this dissertation, we chose *Zamia boliviana*, a cycad from the Cerrado, to describe the reproductive phenology, sex ratio and mutualistic and antagonistic interactions of *Zamia* populations in the natural environment. We evaluated *Zamia* reproductive performance, including the lifespan pattern of strobili, the phenological pattern and sex ratio, as well as the nature of cycad-insect interactions. We discussed how we could associate our findings with the current understanding and conservation of this biological system, taking into consideration the past success of the plant and the contemporary ecosystem regime in which it develops. We argue that the bioclimatic conditions of the Cerrado ecosystem and the biotic interactions involved in cycad development have been essential for its survival. The range of functional attributes of these habitats allows this species to persist as "gymnosperms amid the undoubted diversity of tropical angiosperms" (Forzza et al. 2010; BFG, 2015) in ecosystems driven by deterministic process and founding and stochastic effects. In a literature review about the Zamiaceae family (Chapter one), we found that the number of publications doubled in the 21st century, and they were mostly focused on genetics, taxonomy and systematics, morphology, ecological interactions, with an increasing interest in population ecology and conservation. Investigation about these topics and conservation strategies, especially for South America species of *Zamia*, were pointed out as necessary. In the phenological study (Chapter two), we identified a seasonally synchronous reproductive pattern, with predominance of emergence stage, pollen release and strobili receptivity, which were equally compatible between sexes, populations and subsequent years. The lifespan of strobili resembles the morphological and temporal distinction typical of *Zamia* spp., with a marked difference in the development of ovuliferous strobili in comparison to polleniferous strobili. The sex ratio study (Chapter three) showed a predominantly male bias for most of the populations examined. This result was mainly attributed to differences in reproductive costs. Specialized and obligate antagonistic interactions are typical of cycads around the world, such as those of *Eumaeus minyas* Hübner (Lepidoptera: Lycaenidae) (Chapter four) and those registered for *Z. boliviana*. Periodic observations of cycad populations and the conduct of experiments in the natural

environment revealed insect visitors (seasonal visitors and opportunistically unreliable visitors), their behavior and the efficiency as vectors of pollination (Chapter five). The results demonstrated that wind is not necessary for pollination of this cycad. On the other hand, we revealed the existence of obligate and specialized mutualism between a species of beetle and this cycad, which is a mechanism also known in other *Zamia* spp. The host cycad is pollinated by a new species of *Pharaxonotha* (Coleoptera: Erotylidae) as described in this dissertation. *Pharaxonotha cerradensis* Skelley and Segalla maintains its life cycle in association with the reproductive structures of *Z. boliviana* and the bioclimatic seasonality of the Cerrado. It is likely that the combination of physical, chemical and biological factors (e.g., bioclimatic, morphological, adaptive, defensive and interactions) allowed the survival of this and other *Zamia* spp. to other understory plants. Our research corroborates previous studies on the biology and ecology of *Zamia* spp. and points to the need for research with dioecious species and their interactions in South America. This knowledge is essential to understand and conserve biological systems co-dependent on endemic, rare and long-lived species, such as the relic and ecologically restricted populations of *Zamia* spp.

Keywords: Cycad conservation, Beetle life cycle, Ecological interactions, Host plants, Obligate-herbivores, Lifespan strobili, Reproductive system, Reproductive timing, Sex bias, Reproductive cost

References

- Catálogo de plantas e fungos do Brasil / [organização Rafaela Campostrini Forzza... et al.]. - Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. 2.v. : il.
- Zappi, D. C., F. L. R., Filardi, P., Leitman, V. C., Souza, B. M. T., Walter, J. R., Pirani, V. F. Mansano et al. 2015. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. *Rodriguésia* 66: 1085–1113. doi:10.1590/2175-7860201566411

GENERAL CONCLUSIONS



Fui criada no mato e aprendi a gostar das coisinhas do chão - Antes que das coisas celestiais.

(Modificado de BARROS, Manoel de. Retrato do artista quando coisa. Rio de Janeiro: Record, 1998.)
Photo credits: Rosane Segalla, personal collection.

This dissertation presents the current knowledge on Zamiaceae, with emphasis on *Zamia* from South America (Chapter I). It contains the results of phenological patterns (Chapter II) and sex ratio (Chapter III) from the case study with populations of *Z. boliviana* in the natural environment. It also gathers biotic interactions associated with this cycad. One case is the registration of *Eumaeus minyas* Hübn. (Lepidoptera: Lycaenidae), first for a species of *Zamia* in Brazil (Chapter IV). The other study case describes a species of *Pharaxonotha* (Chapter V) as the only potential pollinator of this cycad. These ecological interactions and other opportunistic or non-obligate visitors have been carefully described over approximately five years of observations.

It is promising that many of the genera and species of this family are already well-studied. However, after considering the species richness of the genus *Zamia* in South America, where many of them are still biologically, ecologically and phylogenetically little known according to the systematic review of Zamiaceae (Chapter I) and the case study with *Z. boliviana* (Chapter II-V), we conclude that:

- i) *Zamia boliviana* was a good model for initial studies with dioecious species, especially *Zamia* from South American ecosystems;

- ii) Phenological studies that identify recurrence patterns in biological events, such as the phenological study with *Z. boliviana* (Chapter II), are expensive in time and resources but are essential in the tropics. Our study with *Z. boliviana* consisted of populations in the natural environment and is unprecedented for *Zamia* spp. from South America. The results are promising as they showed a synchronous reproductive phenological pattern in the two populations studied, which is an essential requirement for the reproductive health of dioecious populations;
- iii) Studies focused on the origin of patterns and processes involving dioecious systems, such as those that pointed out a predominantly male bias in *Z. boliviana* (Chapter III), are recommended for other dioecious species. Long-term monitoring of dioecious populations in their natural habitat may bring greater clarity to studies of this nature and lend support to the arguments that deterministic forces (e.g., environmental filtering) and stochastic processes (e.g., anthropic effects, variation in sex ratio and population density, resource availability) possibly regulate the dynamics of these ecological systems. These studies are fundamental to predict the likely responses of these systems to environmental changes;
- iv) Data surveys on the natural history of tropical biodiversity, such as the antagonistic and obligate interaction between *E. minyas* and *Z. boliviana* (Chapter IV), are important, especially at present. Such studies allow identifying not only agents in interaction but the dependence level with their host plants, the areas of co-occurrences and evaluating the stability of these associations in times of constant habitat change, and finally,
- v) Studies that demonstrate opportunistic or mutualistic ecological interactions, including our description of specialized and obligate mutualism between *Z. boliviana* and *P. cerradensis* (Chapter V), should be prioritized. This study model show plant-pollinator interactions from the perspective of dioecy, an obligate mutualism, and the consequences of imbalance or loss of these interactions for both. A good understanding of these interactions will bring more light to the accumulated knowledge and allow us to advance towards new concepts about reproductive systems and the exactitude of these contemporary biological interactions.

Overall, our research using the case study with *Z. boliviana* showed that the reproductive events (as shown in the phenological and sex ratio study) of this cycad are shaped by the bioclimatic and seasonal factors of the Cerrado. Also, the life cycles of *E. minyas* and *P. cerradensis* are synchronized with the lifespan of the organs of this host plant.

The biological and socio-cultural importance of cycads and other dioecious species makes studies on this group of rare, endemic and long-lived species, as well as their interactions, even more essential. Although the knowledge of the biological history of these species in their original habitats is challenging, they should be encouraged within the scientific community. The gains from these efforts are directed towards science and

societies. The integration of results, including those from this case study, to other areas of science produces more complete responses with positive effects for different decision-making purposes.

New challenges include fostering and implementing actions with public or private organizations and society, in general, to continue studies similar to the current study. Furthermore, the application of results in conservation strategies of dioecious populations, especially *Zamia* spp., in public or private areas and biological collections is crucial. It should be a permanent attempt to safeguard integrating and sustaining elements of a region with marked biodiversity hotspots. Most of them are still little known and have been defined by historical processes under the influence of contemporary factors.