



Universidade Federal Rural de Pernambuco
Programa de Pós-Graduação em Botânica

Thatiany Teixeira Bezerra

**Isolamento reprodutivo e reciprocidade em
espécies simpátricas de *Chamaecrista* Moench.
(Fabaceae)**

Recife, 2019

Thatiany Teixeira Bezerra

**Isolamento reprodutivo e reciprocidade em
espécies simpátricas de *Chamaecrista* Moench.
(Fabaceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Botânica da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Mestra em Botânica.

Orientador: Dr. Natan Messias de Almeida
Co-orientadora: Dra. Cibele Cardoso de Castro

Recife, 2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

B574i Bezerra, Thatiany teixeira
Isolamento reprodutivo e reciprocidade em espécies simpátricas de *Chamaecrista*
Moench. (Fabaceae) / Thatiany teixeira Bezerra. – 2019.
92 f. : il.

Orientador: Natan Messias de Almeida.
Coorientadora: Cibele Cardoso de Castro.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Programa de Pós-Graduação em Botânica, Recife, BR-PE, 2019.
Inclui referências e anexo(s).

1. Angiosperma 2. Plantas – Reprodução 3. Híbridação vegetal 4. Fertilização de plantas 5. Botânica – Morfologia I. Almeida, Natan Messias de, orient. II. Castro, Cibele Cardoso de, coorient. III. Título

CDD 581

À Deus, ao meu companheiro Álvaro, minha família, parentes e aos meus amigos pelo amor, ajuda e apoio.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço à todas as pessoas que direta ou indiretamente tornaram possível a realização deste estudo, em especial:

À minha família, minha mãe Maria José e meu pai Francisco, minha vó edite (*in memoriam*), aos meus irmãos: Danielly, Thiago e Thais que são tudo em minha vida e por simplesmente existirem e fazerem parte desta caminhada.

À Álvaro pelo amor, companheirismo, e por toda ajuda no campo durante a realização deste estudo. Essa conquista também é sua.

Ao meu sogro, Alvino Bandeira (*in memoriam*) pelo apoio, consideração e incentivo. Nalva e Cristina pela companhia no campo, pela alegria e momentos de descontração na reserva. À Maciano pelo auxílio nos experimentos e boa companhia.

Ao Professor Natan, meu orientador, na graduação, no mestrado e na vida. Agradeço principalmente pela confiança, incentivo, compreensão, e por todas as oportunidades concedidas ao longo de todos esses anos.

À Professora Cibele minha co-orientadora pelas sugestões e pela colaboração.

Aos companheiros de turma, em especial Tiago, Aline, Camila, Fabiana, Cris e Monara. Pelos momentos compartilhados.

As sugestões concedidas pela banca examinadora.

Ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal Rural de Pernambuco (PPGB) e aos integrantes do Laboratório de Ecologia Reprodutiva (LERA/UFRPE) pelo apoio.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

Sumário

Lista de figuras	v
Lista de tabelas	vi
Resumo Geral	vii
General Abstract	viii
1. Introdução Geral	13
2. Revisão bibliográfica	15
3. Referências bibliográficas	20
4. Capítulo 1. Barreiras de isolamento reprodutivo em espécies de <i>Chamaecrista</i> Moench. (Fabaceae)	27
Resumo.....	28
Introdução	29
Material e métodos	31
Resultados	34
Discussão	38
Conclusão.....	42
Referências bibliográficas	43
5. Capítulo 2. Reciprocidade em flores enantioestéricas de <i>Chamaecrista</i> Moench. (Fabaceae)	53
Resumo	55
Introdução	56
Material e Métodos	58
Resultados	59
Discussão	62
Referências bibliográficas	65
6. Anexos	73

Lista de figuras

Figura 1. Esquema de espécies enantiostílicas. A) enantiostilia monomórfica no nível da flor (randômica e não randômica); B) enantiostilia monomórfica no nível da inflorescência; C) enantiostilia dimórfica no nível da planta (Adaptado de Barret, 2002).....17

Capítulo 1

Figura 2. Distribuição espacial das populações de *Chamaecrista* (Fabaceae) georreferenciadas na RPPN de Nossa Senhora do Oiteiro de Maracaípe, Ipojuca, Pernambuco, Brasil. Os pontos representam ocorrência das espécies estudadas e as cores o número de indivíduos reprodutivos encontrados para cada população (SIRGAS:2000; Por: Alessandra K.G. Targino, 2018).....48

Figura 3. Representação do índice de atividade floração (%) em espécies de *Chamaecrista* (Fabaceae): *C. flexuosa*; *C. ramosa*; *C. rotundifolia*; *C. rotundifolia* var. *rotundifolia* e *C. hispidula*, na RPPN de Nossa Senhora do Oiteiro de Maracaípe, Ipojuca- PE. As cores representam a proporção 100% (verde); 75% (azul); 50% (cinza) e 25% (marrom).....49

Capítulo 2

Figura 1. Flores das espécies de *Chamaecrista* (Fabaceae): A) *C. ramosa* e B) *C. rotundifolia* na RPPN de Nossa Senhora do Oiteiro de Maracaípe, Ipojuca (PE).....68

Figura 2. Posicionamento das pétalas (deposição do pólen) da espécie *C. rotundifolia*, (A) morfo esquerdo e (B) morfo direito e posicionamento das pétalas (deposição do pólen) da espécie *C. ramosa*, (C) morfo esquerdo e (D) morfo direito.....69

Figura 3. Posicionamento dos estigmas (captação do pólen) da espécie *C. rotundifolia*, (A) morfo esquerdo e (B) morfo direito e posicionamento dos estigmas (captação do pólen) da espécie *C. ramosa*,

(C) morfo esquerdo e (D) morfo direito.....	70
---	----

Figura 4. Reciprocidade total de morfos opostos de *C. rotundifolia* (estigma x pétala), (A) morfo esquerdo e (B) morfo direito e reciprocidade total de morfos opostos de *C. ramosa* (estigma x pétala recíproca), nos (C) morfo esquerdo e (D) morfo direito.....

71

Figura 5. Relação de reciprocidade entre as espécies de *C. rotundifolia* e *C. ramosa*: (A) estigma esquerdo de *C. rotundifolia* X pétala esquerda de *C. ramosa*; (B) estigma direito de *C. rotundifolia* X pétala direita de *C. ramosa*; (C) estigma direito de *C. ramosa* X pétala direita de *C. rotundifolia* e (D) estigma esquerdo *C. ramosa* X pétala esquerda *C. rotundifolia*.....

72

Lista tabelas

Capítulo 1

Tabela 1. Cruzamentos bidirecionais, entre espécies sincronopátricas de *Chamaecrista* ocorrentes na RPPN Nossa Senhora do Oiteiro de Maracaípe, PE. R x D=Receptor x Doador; C: Cruzamento bidirecional; FF=Formação de Frutos; G%= Porcentagem de germinação das sementes híbridas por tamanho da amostra (N).....

50

Tabela 2. Diversidade de visitantes florais de cinco espécies de *Chamaecrista*, na RPPN Nossa Senhora do Oiteiro de Maracaípe-PE.....

51

Tabela 3. Apresentação das barreiras de separação existentes entre espécies de *Chamaecrista* (Fabaceae).....

52

RESUMO GERAL

O conhecimento das estratégias reprodutivas interespecíficas permite formular hipóteses sobre os eventos que levam à existência e manutenção das barreiras naturais. Estudos têm relatado a existência de híbridos em *Chamaecrista*. Objetivamos investigar as barreiras de isolamento reprodutivo entre espécies simpátricas de: *C. ramosa*; *C. rotundifolia*; *C. rotundifolia* var. *rotundifolia*; *C. hispidula* e *C. flexuosa*. O estudo foi realizado na RPPN de Nossa Senhora do Oiteiro de Maracaípe, Ipojuca-PE. No primeiro capítulo foram investigados os possíveis barreiras de isolamento reprodutivo através: 1) observação da distribuição no espaço das populações naturais (barreira espacial); 2) acompanhamento do período de floração (barreira temporal); 3) descrição dos tipos enantiofílicos (barreira morfológica) e 4) cruzamentos interespecíficos bidirecionais (barreira fisiológico); e 5) investigação de partilha de polinizadores (barreira ecológica). Todas as espécies foram consideradas sincronopátricas, pois têm em comum a sobreposição da distribuição espacial dos agrupamentos e do período de floração, entretanto com estratégias diferenciadas. Todos os cruzamentos formaram frutos, com exceção de *C. flexuosa* x *C. rot. var. rotundifolia*. O sucesso nos tratamentos de polinização mais expressivo foi de 80% para *C. rotundifolia* x *C. rot. var. rotundifolia*, em contrapartida, houve baixa formação entre *C. flexuosa* x *C. hispidula*, *C. flexuosa* x *C. ramosa* (5%) cada. Nos cruzamentos envolvendo *C. flexuosa* e *C. ramosa* foi observado o elevado aborto dos frutos (89,5-95%), por volta de 5 a 10 dias após a polinização. A germinação de sementes híbridas apresentou baixa viabilidade relacionada às espécies *C. ramosa* e *C. hispidula* (G=8-24%). As máximas porcentagens de germinação ocorrem para *C. rot. var. rotundifolia* x *C. hispidula* (G=100%) e *C. hispidula* x *C. rot. var. rotundifolia* (G=83,3%). Abelhas do gênero *Florilegus* sp. visitam flores do tipo Ramosa o que sugere potencial para hibridação contínua. Todos os visitantes florais foram abelhas, sendo que *C. ramosa* recebeu a maior diversidade de visitantes (n=8). *Xylocopa carbonaria*, *X. cearense* e *Eufrisea* sp. partilham flores de *C. flexuosa* e *C. ramosa*. *Eufrisea* sp. esteve presente em todas as espécies de *Chamaecrista* estudadas, com exceção apenas de *C. rotundifolia*. A análise dos Tipos enantiofílicos apontou três diferentes: Ramosa, Flexuosa, Amiciella. Sugerimos que, sua funcionalidade demonstrou maior eficiência como barreira de isolamento, já que quando presente indicou redução no sucesso pré e pós reprodutivo. Para o segundo capítulo, investigamos a possibilidade de desvios de reciprocidade entre duas espécies na mesma área de estudo supracitada, indicando a relação do sistema reprodutivo e as variações de respostas adaptativas das populações naturais a processos de mudanças ambientais em relação ao padrão hercogâmico recíproco. Objetivamos analisar a

reciprocidade intra e interespecífica em flores enantiostílicas de *C. ramosa* e *C. rotundifolia*. Através de um banco de imagens de flores das espécies, com escala em milímetros. Foram realizadas medições a partir de imagens em 10 flores abertas do dia por 10 (*C. ramosa*; n=100) e cinco (*C. rotundifolia*; n=50) dias, em três agrupamentos por espécie. Foram analisadas em um tabuleiro gradeado (letras x números) e com auxílio do software power point, foram medidos em cada flor os seguintes caracteres: altura e afastamento em relação ao centro floral do estigma e da pétala falcada, além do diâmetro floral. Verificamos que dias intercalados há produção de flores de maiores tamanhos. Para *Chamaecrista ramosa* a morfologia floral variou entre 20,7-24,3mm e *C. rotundifolia* variou de 7,7-12,6mm de comprimento. *C. ramosa* apresenta, maior tamanho floral e maior amplitude de captação e deposição de pólen comparado à *C. rotundifolia*, sendo assim, pode apresentar-se como promotor de aumento da área de deposição e captação de pólen no corpo do polinizador, aumentando a especificidade dos cruzamentos e reduzindo as chances de geitonogamia.

Palavras-Chave: Cassiinae; Enantiostilia monomórfica; Híbridos; Hercogamia recíproca.

GENERAL ABSTRACT

Knowledge of interspecific reproductive strategies allows us to formulate hypotheses about the events that lead to the existence and maintenance of natural barriers. Studies related to the existence of hybrids in *Chamaecrista*. We aim to investigate how barriers of reproductive isolation among the sympatric species of: *C. ramosa*; *C. rotundifolia*; *C. rotundifolia* var. *rotundifolia*; *C. hispidula* and *C. flexuosa*. The study was conducted at the RPPN of Nossa Senhora do Oiteiro de Maracaípe, Ipojuca-PE. In the 1st chapter The possible barriers of reproductive isolation were investigated through: 1) Observation of the distribution in the space of the natural borders; 2) monitoring the flowering period; 3) description of the enantiosthetic types (morphological barrier) and 4) interspecific two-way crosses (physiological barrier); and 5) pollinator-sharing research (ecological barrier). This species were observed synchronoptric, which have in common the overlapping the distribution of the wagon of the weddings and the period of floration. All crosses were fruits, with the exception of *C. flexuosa* x *C. rotundifolia* var. *rotundifolia*. The success in the most expressive pollination treatments was 80% for *C. rotundifolia* x *C. rotundifolia* var. *rotundifolia*, in contrast, low formation between *C. flexuosa* x *C. hispidula*, *C. flexuosa* x *C. ramosa* (5%) each. In the crosses in contact with *C. flexuosa*

and *C. ramosa* the high fruit volume (89.5-95%) was observed, around 5 to 10 days after a pollination. Seed germination was the viability of the species *C. ramosa* and *C. hispidula* ($G = 8-24\%$). The maximum germination macroscopies occur for *C. rotundifolia* var. *rotundifolia* x *C. hispidula* ($G = 100\%$) and *C. hispidula* x *C. rotundifolia* var. *rotundifolia* ($G = 83.3\%$). Bees of the genus *Florilegus* sp. visit flowers of the *Ramosa* type, suggesting the potential for continuous hybridization. All floral cases were bees, with *C. ramosa* receiving a greater diversity of visitors ($n = 8$). *Xylocopa carbonaria*, *X. cearense* and *Eufrisea* sp. share *C. flexuosa* and *C. ramosa* flowers. *Eufrisea* sp. present in all studied *Chamaecrista* species, except for *C. rotundifolia*. An analysis of the enantiosthetic types pointed out three different: *Ramosa*, *Flexuosa*, *Amiciella*. That, its functionality demonstrate greater efficiency as barrier of isolation, since the present indicates reduction in the pre and post reproductive success. For this chapter, we investigated the possibility of reciprocity deviations between species and the same area of study mentioned above, relating to the reproductive system and the variables of adaptive response of the natural forces in relation to the reciprocal hercogamic pattern. We aimed the intra and interspecific reciprocity in enantiostyl flowers of *C. ramosa* and *C. rotundifolia*. Through a bank of images of flowers of the species, with scale in millimeters. The images were collected in 10 open flowers of the day for 10 (*C. ramosa*, $n = 100$) and five (*C. rotundifolia*; $n = 50$) days in three groups per species. They were analyzed in a grid tray (letters x numbers) and with the aid of the power point software, in addition to making the floral flowering, besides the floral floral of the stigma and the faltal petal. We verified that interspersed days there is production of flowers of larger sizes. For *Chamaecrista ramosa* the floral morphology varied between 20.7-24.3mm and *C. rotundifolia* ranged from 7.7-12.6mm in length. *C. ramosa* presents a larger floral size and a greater amplitude of uptake and deposition of pollen compared to *C. rotundifolia*, being thus able to present as a promoter of increase of the area of deposition and capture of pollutant pollen, increasing the specificity of the crosses and reduction as chances of geitonogamy.

Keywords: Cassiinae; Monomorphic enantiostilia; Hybrids; Reciprocal Hercogamy.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Cerca de 90% das angiospermas apresentam flores com estames e estigmas funcionais, sendo classificadas como hermafroditas (Ainsworth, 2000). Embora ocorra entre a maioria, o hermafroditismo pode ocasionar impactos negativos na reprodução (Barrett, 2002; Charles Worth e Willis, 2009), considerando que pode levar à autopolinização. No entanto, algumas espécies desenvolveram estratégias reprodutivas que limitam a autopolinização, tais como a separação temporal (dicogamia) da maturação sexual e espacial (hercogamia) dos órgãos sexuais em uma mesma flor. Estes mecanismos reduzem o conflito entre a função reprodutiva feminina e masculina e podem proporcionar maiores oportunidades de fluxo gênico entre as populações naturais, sem alterar o processo básico de polinização cruzada (Barrett, 2002).

O mecanismo de hercogamia está relacionada a reciprocidade em espécies polimórficas, e este processo geralmente é geneticamente controlado entre morfos florais (Barrett, 2002), este polimorfismo floral indica aumentar a precisão na transferência de pólen (Darwin, 1877; Barrett, 2002) e promove a polinização cruzada entre os dois morfos florais (Ganders et al., 1985). Então, sugere-se que a polinização legítima em espécies polimórficas é facilitada, pois ocorre uma deposição de pólen em partes distintas do corpo do polinizador que corresponde com a altura da posição do estigma do morfo oposto (Massinga et al., 2005). Adicionalmente, cruzamentos intermorfos são responsáveis pela razão equilibrada entre os dois morfos dentro de populações ou isopleia (Barrett et al., 2000).

A enantiostilia compreende um tipo de hercogamia recíproca, na qual o estilete possui deflexão recíproca para a esquerda ou direita de uma flor em relação ao centro floral, formando imagens especulares (Barrett, Jesson e Baker, 2000; Jesson e Barrett, 2003). Este polimorfismo apresenta-se de duas formas, monomórfica (indivíduos apresentam flores de diferentes morfos de forma aleatória - randômica, de forma alternada - não randômica ou até mesmo um único morfo por inflorescência) e dimórfica (indivíduos apresentam apenas um morfo floral; Barrett, 2002). Geralmente os morfos florais apresentam-se em proporção semelhantes nas populações, o que também é encontrado para espécies heterostílicas (Barrett, 2002; Almeida et al., 2013a).

Entretanto, é possível que espécies polimórficas recíprocas possam ter desvios na sua reciprocidade, resultando em variações no sistema reprodutivo devido à evolução de diferentes

graus de autocompatibilidade entre espécies e nos seus morfos ou pela perda total ou parcial da hercogamia recíproca (Barrett e Cruzan, 1994, Ganders 1979, Consolaro *et al.*, 2005). Porém, alterações drásticas do sucesso reprodutivo podem ser a principal consequência do aumento na separação entre estigma e antera de morfos diferentes (Dai e Galloway, 2011). A quebra desse padrão está relacionada ao rompimento do supergene responsável pela expressão dos morfos florais e sistema reprodutivo (Barret, 1992), originando assim, na maioria das vezes, morfos atípicos ou variantes que são normalmente atribuídos a fatores ecológicos que interferem no fluxo de pólen legítimo (Barret e Richards, 1990). Algumas variações registradas em *Psychotria* permitem a compreensão de processos evolutivos em espécies heterostílicas (Ganders 1979, Barret 1988). Enquanto, em espécies enantioestílicas este processo permanece desconhecido.

Estudos com grupos modelos que promovam evidências da relação de padrões biogeográficos e adaptações ecológicas de caráter morfológico-funcional são inéditos para subtribo Cassiinae (Fabaceae). Incluído neste grupo está o gênero *Chamaecrista* que possui cerca de 330 espécies e distribuição Pantropical (Lewis, 2005). É também um dos gêneros mais complexos taxonomicamente e mais diversos da flora brasileira, representado por 259 espécies, das quais 216 são endêmicas (Flora do Brasil 2020, 2019). *Chamaecrista* tem seu centro de diversidade no Cerrado, porém, os grupos que divergiram mais “cedo” habitam florestas da Amazônia e da Mata Atlântica, sugerindo uma possível origem em florestas úmidas e uma posterior diversificação em áreas abertas como na Restinga (Azani *et al.*, 2017) sendo comum nestes ambientes espécies aparentadas de Cassiinae ocorrerem em simpatria.

Dessa forma, populações naturais de espécies relacionadas que habitam a mesma região geográfica podem ser compatíveis quando as barreiras reprodutivas estão abaladas ou enfraquecidas permitindo a chance de ocorrer fluxo gênico entre táxons distintos e possibilitando como consequência a geração de híbridos ou mesmo um processo de especiação (Costa *et al.*, 2007). Estudos indicam registros de formação de híbridos naturais envolvendo espécies de *Chamaecrista* (Costa *et al.*, 2013; Correia e Conceição, 2017), a qual pode estar relacionada a ocorrência de espécies sincronopátricas que partilham polinizadores. Dentre as barreiras que promovem o isolamento reprodutivo das espécies, destacam-se diferenças na fenologia, não compartilhamento de polinizadores, deposição de pólen em locais diferentes do corpo dos polinizadores e sistemas de incompatibilidade interespecífico (Bradshaw *et al.*, 1995; Franceschinelli, 2005), entretanto as barreiras podem apresentar fragilidades, possibilitando o desenvolvimento de descendentes híbridos nas gerações seguintes (Gouveia e Pinheiro, 2015; Ramsey *et al.*, 2003). Nesse sentido, o conhecimento das características reprodutivas de

espécies que promovam a incompatibilidade interespecífica, permite formular hipóteses sobre os eventos que levam à existência e manutenção do isolamento reprodutivo (Boecklen e Howard, 1997; Cozzolino et al., 2006; Baack e Rieseberg, 2007; Moraes et al., 2013).

Propomos neste estudo investigar se existem e quais são as barreiras de isolamento reprodutivo ocorrentes em espécies sincronopátricas enantiofilicas de *Chamaecrista*. Baseando-se nessas observações, sugerimos as seguintes hipóteses: 1) Barreiras reprodutivas morfológicas são eficientes para promover o isolamento entre espécies simpátricas e enantiofilicas para subtribo Cassiinae; 2) A relação de reciprocidade intraespecífica é maior para promover a movimentação de pólen cruzado, porém sendo menor a reciprocidade entre órgãos reprodutivos dentro do indivíduo e entre espécies distintas, constituindo uma barreira para prevenir a autopolinização e hibridização, respectivamente.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Enantiofilia: Conceito e Funcionalidade*

Cerca de 90% das angiospermas apresentam flores com estames e estigmas funcionais, sendo classificadas como hermafroditas (Ainsworth, 2000). Embora as espécies tenham evoluído com barreiras que impeçam a autofecundação, o hermafroditismo pode ocasionar impactos negativos na reprodução (Barrett, 2002; Charlesworth e Willis, 2009).

Diversas estratégias que permitem a manutenção das estruturas masculinas e femininas em uma mesma unidade floral, sem que ocorra autofecundação, surgiram ao longo da evolução das Angiospermas (Barrett, 2002; Jesson e Barrett, 2003). Dentre estes mecanismos morfológicos, destacam-se a separação temporal (dicogamia) e a espacial (hercogamia) dos órgãos reprodutivos em uma mesma flor (Oliveira e Maruyama, 2014). Ainda que sejam estratégias proveitosas, nem sempre são eficazes para impedir a autofertilização, que pode ocorrer por geitonogamia e autopolinização (Matias et al., 2016).

Um polimorfismo floral morfológico-estrutural conhecido em plantas desde o século XIX é a enantiofilia, conhecida pela separação espacial das estruturas reprodutivas e descrita como um tipo de hercogamia recíproca que atua na redução da autopolinização (Todd, 1882;

Wilson, 1887; Robertson, 1890; Thorp e Estes, 1975; Barrett 2002; Jesson e Barrett, 2005). Este polimorfismo caracteriza-se por apresentar flores que formam imagens especulares uma sobre a outra (Jesson e Barrett, 2005).

A enantiostilia é geneticamente determinada com morfos florais recíprocos, os quais podem apresentar a estrutura sexual feminina direcionada para a direita ou esquerda do eixo floral, em alguns casos, essa reciprocidade é acompanhada pela localização das pétalas (Westerkamp, 2004; Jesson e Barrett, 2002; Almeida et al., 2013ab). Este posicionamento diferenciado gera um padrão de deposição e captação de pólen que favorece o cruzamento entre os morfos, similarmente ao que ocorre com espécies heterostílicas, outro caso de hercogamia recíproca (Barrett, 2002). A tendência observada nos estudos foi que este sistema parece conduzir ao aumento da eficiência da capacidade de uso de pólen na reprodução, e assim, otimizar a função masculina (Oliveira e Maruyama, 2014).

Na literatura a enantiostilia, de modo geral, é interpretada como uma mecanismo floral que favorece a polinização cruzada e reduz as chances de autopolinização por geitonogamia (Tood, 1822; Irwin e Barneby, 1976; Dulberger, 1981; Gottsberger e Silberbauer-Gottsberger, 1988; Bahadur et al., 1990; Fenster, 1995; Laporta, 2005; Almeida et al., 2015ab), devido à coincidência na deposição e captura de pólen no corpo do polinizador por flores de morfos opostos (Almeida, 2012).

Contudo, alguns estudos afirmam que este mecanismo surgiu com o objetivo de proteção de estruturas florais, já que durante as visitas, a vibração das abelhas poderia danificar o gineceu (Dulberger, 1981). Recentemente, novas propostas têm apontado que esta característica favorece a eficácia na captação do pólen em maior extensão do corpo dos visitantes (Almeida et al., 2013b).

E embora a diversidade das espécies de *Chamaecrista*, ampla distribuição geográfica e interesse esporádico de pesquisas, estudos envolvendo a interação entre a biologia floral com o polinizador ainda são superficiais, sendo assim, o conhecimento sobre a funcionalidade adaptativa legítima da enantiostilia permanece incompreendida (Barrett, Jesson e Baker, 2000; Jesson e Barrett, 2002) com isso, acreditamos na necessidade da realização de estudos que possibilitem investigações mais completas nesse sentido.

2.2. Variações na enantioestilia

Espécies enantioestílicas dimórficas produzem apenas um dos morfos florais por indivíduo. Por outro lado, as monomórficas produzem flores de diferentes morfos de forma aleatória (randômica), de forma alternada (não randômica), ou até mesmo, um único morfo por inflorescência, e podem apresentar dinâmicas distintas na produção de morfos, caracterizando diferentes estratégias de reprodução de acordo com a figura 1 (Barrett 2002; Almeida et al., 2015b).

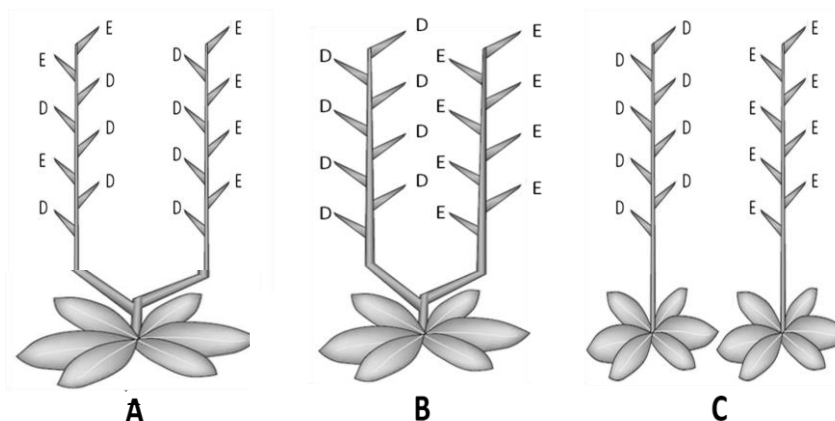


Figura 1. Esquema de espécies enantioestílicas. A) enantioestilia monomórfica a nível da inflorescência (randômica e não randômica, respectivamente); B) enantioestilia monomórfica no nível da inflorescência; C) enantioestilia dimórfica no nível da planta. (Adaptado de Barret, 2002).

Outra classificação diz respeito à localização das estruturas sexuais masculinas que pode posicionar-se de modo a) recíproco: quando os estames ocorrem em posição inversa ao gineceu nos morfos florais ou; b) não recíproco: quando o posicionamento dos estames não é alterado, independente do posicionamento do gineceu. Estudos realizados por Jesson e Barrett (2003), demonstram que espécies enantioestílicas possuem como ancestrais representantes com estilete em uma única posição, passando do tipo monomórfico e posteriormente à forma dimórfica.

Embora, dentro desse padrão enantioestílico alguns autores descrevam que sua funcionalidade permaneceu intacta desde sua descoberta (Gottsberger e Silberbauer-Gottsberger, 1988; Carvalho e Oliveira, 2003, Ribeiro e Lovato, 2004; Westerkamp, 2004; Laporta, 2005; Almeida, 2012), estudos sugerem a possibilidade desse sistema apresentar desvios, considerados como “atípicos” em relação ao padrão hercogâmico recíproco (Almeida et al., 2013b). As variações registradas têm sido relacionadas a mecanismos de deposição de pólen das anteras e sua captura pelo estigma no corpo do polinizador (Carvalho e Oliveira, 2003; Almeida et al., 2013).

Através de novos registros feitos por Almeida e colaboradores (2013) foi verificada a presença deste desvio, classificado como enantioestilia atípica, em *C. flexuosa* (L.) Greene. Esta espécie exibe um terceiro morfo, tendo o gineceu posicionado centralmente em relação ao eixo floral, e ainda, ausência de isopleτία nas populações naturais. Assim, propõe que é possível a ocorrência desses desvios para outras espécies polimórficas. Este fato trouxe novas discussões acerca de investigações sobre a funcionalidade ecológica deste mecanismo. Além disso, os autores notaram particularidades como no percurso dos grãos de pólen, que às vezes é conduzido secundariamente pelas pétalas para chegar ao corpo do polinizador (Almeida et al., 2013b; Almeida, 2015a). Possíveis explicações para modelos atípicos estão relacionados a impactos ambientais, tais como ausência ou ineficiência dos serviços de polinização ou perda de um dos morfos na população, em espécies heterostílicas (Barrett, 2002).

Diante deste cenário, ressalta-se que espécies enantioestílicas apresentam ampla diversidade de tipos florais, e que até recentemente, considera-se que esta diversidade não se estendia aos seus mecanismos de reprodução (Almeida et al., 2014; 2015b). Segundo estes autores, na subtribo Cassiinae (Leguminosae - Fabaceae), o reconhecimento de diferentes Tipos Enantioestílicos (TEs) levantam várias possibilidades para estratégias de reprodução de outros grupos de plantas polimórficas.

Almeida et al. (2015a), afirmam que níveis de complexidade diferentes refletem a diversidade morfológica e esse modelo fornece estratégias singulares na captura e deposição de pólen durante o serviço de polinização. Esta proposição permitiu a organização da ampla diversidade de barreiras reprodutivas evoluídas dentro de Cassiinae em categorias funcionais e, sendo a maior parte dessas classes consistentes com critérios taxonômicos e filogenéticos atuais.

2.3 Isolamento reprodutivo

As estratégias reprodutivas afetam os mecanismos microevolutivos como seleção, fluxo gênico, deriva genética, influenciando a diferenciação das populações. A fenologia trata da ocorrência de eventos biológicos repetitivos, suas causas em relação a fatores bióticos e abióticos e as inter-relações entre as fases caracterizadas por esses eventos, da mesma ou de diferentes espécies (Morellato et al., 1989; Mazza et al., 2011). Desta forma, diferenças nas épocas de floração podem ter enormes implicações sobre a seleção e estrutura genética da população (Hirao e Kudo, 2008; Matsumoto et al., 2013).

Grupos taxonômicos relacionados e que apresentam sincronia na floração e simpatria, possibilitam a partilha ou competição de visitantes florais (Levin e Eerson, 1970; Sakai, 2008), a partilha de polinizadores pode causar impacto negativo no sucesso reprodutivo das populações naturais de plantas e até mesmo resultar em hibridização. A competição, por sua vez, pode interferir no número de polinizadores e de visitas às flores e levar os indivíduos vegetais ao isolamento reprodutivo (Murcia, 1995). Portanto, o fluxo gênico entre táxons simpátricos pode ocorrer quando não existem barreiras para a manutenção do isolamento reprodutivo, ou quando estas são fracas, assim possibilitem a formação de zonas híbridas, introgressão, ou mesmo especiação por hibridização (Costa et al., 2013). Porém, plantas podem utilizar artifícios que interfiram na interação e atuação dos polinizadores (Oliveira e Maruyama, 2014).

Neste contexto, o isolamento reprodutivo das espécies envolve diversas barreiras, que atuam em diferentes etapas da reprodução, podendo ser pré-zigóticas e pós-zigóticas (Ellstre et al., 1996; Scopece et al., 2010). No primeiro, destacam-se diferenças em épocas de floração, não compartilhamento de agentes polinizadores (devido a diferenças nas características florais), deposição de pólen em locais diferentes do corpo dos polinizadores (Endress, 1994; Franceschinelli, 2005), além de sistemas de incompatibilidade interespecífico atuam na germinação do pólen (Bradshaw et al., 1995), na singamia (Lexer et al., 2005), na formação de frutos e/ou de sementes. Nas barreiras pós-zigóticas incluem especialmente inviabilidade e a esterilidade e/ou a redução do desempenho reprodutivo dos híbridos (Levin, 1971; Judd et al., 2009, Johnson, 2010; Greiner et al., 2011). Ou até mesmo ser seletivas através de barreiras pós-zigóticas que selecionam a progênie, os quais envolvem o aborto seletivo e a alocação diferencial de recursos. O estudo das barreiras reprodutivas entre espécies que se encontram em tais condições promove, portanto, o entendimento de processos que norteiam a especiação (Colley e Fischer, 2013).

Embora existam controvérsias sobre a melhor forma de definir o que é uma espécie, a grande maioria das definições considera a existência de alguma limitação do fluxo gênico entre linhagens relacionadas que compartilham um ancestral comum (Queiroz, 1996). Nesse sentido, aspectos da biologia reprodutiva de espécies que promovam a incompatibilidade reprodutiva entre os grupos permitem formular hipóteses sobre os eventos e barreiras que fazem com que o isolamento reprodutivo ocorra e seja mantido (Boecklen e Howard, 1997; Cozzolino et al., 2006; Baack e Rieseberg, 2007; Moraes et al., 2013).

Recentemente, Almeida e colaboradores (2015a) descreveram diferentes tipos enantiostílicos em espécies de Cassiinae. Segundo estes autores, as características observadas referem-se basicamente a forma e aos locais de deposição e captação do pólen no corpo dos polinizadores, que além de garantirem elevações nas taxas de xenogamia, podem representar barreiras de isolamento reprodutivo destas espécies.

Estudando o grupo Cassiinae, Costa e colaboradores (2013) verificaram o isolamento reprodutivo de sete táxons de *Chamaecrista*, encontraram híbridos férteis exclusivamente do cruzamento entre *C. blanchetii* x *C. confertifomis*. O que destaca a importância do deslocamento temporal da floração destas espécies como uma barreira de isolamento pré-zigótico. Para outras espécies, o isolamento ocorre por barreiras pós-zigóticas de inviabilidade das sementes. Segundo os autores supracitados, estes processos podem ser algumas das causas das grandes dificuldades taxonômicas envolvidas no grupo. E estas barreiras atuam de maneira sobreposta funcionando como um filtro que confere o isolamento reprodutivo entre os táxons de Cassininae.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AINSWORTH, C. Boys e girls come out to play: the molecular biology of dioecious plants. **Annals of Botany**, v. 86, p. 211-221. 2000.

ALMEIDA, N. M. Comportamento dos visitantes e padrões de deposição e captação de pólen para estimativa do fitness reprodutivo. In: LEAL I.R.; MEIADO M.V.; RABBANI A.R.C.; SIQUEIRA-FILHO J.A. (eds.), **Ecologia da Caatinga: Curso de Campo 2011**. Gráfica Printpex, p. 353-366. 2012.

ALMEIDA, N.M.; de CASTRO, C.C.; de LIMA LEITE, A.V.; NOVO, R. R.; MACHADO, I.C. Enantiostyly in *Chamaecrista ramosa* (Fabaceae-Caesalpinioideae): floral morphology, pollen transfer dynamics and breeding system. **Plant Biology (Stuttgart)**, v. 15, p. 369-375, 2013a.

ALMEIDA, N.M.; CASTRO, C.C.; LEITE, A.V.; NOVO, R. R.; MACHADO, I.C. Floral polymorphism in *Chamaecrista flexuosa* (Fabaceae-Caesalpinioideae): a possible case of atypical enantiostyly?. **Annals of Botany**, v. 112, p. 1117-1123. 2013b.

- ALMEIDA, N.M.; COTARELLI, V.M.; SOUZA, D.P.; NOVO, R.R.; SIQUEIRA FILHO, J.A.; OLIVEIRA, P.E.; CASTRO, C.C. Enantiostylous types of Cassiinae species (Fabaceae-Caesalpinioideae). **Plant Biology (Stuttgart)**. 2015a.
- ALMEIDA, N. M.; BEZERRA, T.T.; OLIVEIRA, C. R.S.; NOVO, R.R.; SIQUEIRA-FILHO, J.A.; OLIVEIRA, P.E.; CASTRO, C.C. Breeding systems of enantiostylous Cassiinae species (Fabaceae, Caesalpinioideae). **Flora (Jena)**, v. 215, p. 9-15, 2015b.
- AZANI, N.; BABINEAU, M.; Donovan, B.C. et al. A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. **Taxon**, v. 66, p. 44-77, 2017.
- BAACK, E.J.; RIESEBERG, L.H. A genomic view of introgression e hybrid speciation. **Current Opinion in Genetics e Development**, v. 17, n. 6, p. 513-518, 2007.
- BAHADUR, B. CHATUVERDI, A.; RAMA SWARY, N.S.E.M. Studies of pollen in relation to enantiostyly e heteranthery in Cassia (Caesalpinaceae). **Journal Palynology**, v. 1, p.7-22. 1990.
- BARRETT, S.C.H., JESSON, L.K.; BAKER, A. M. The evolution e function of stylar polymorphisms in flowering plants. **Annals of Botany**, v.85, p. 253–265. 2000.
- BARRETT,S.C.H. The evolution of plant sexual diversity. **Nature Reviews Genetics** v.3, p. 274–284. 2002.
- BOECKLEN, W.J.; HOWARD, D.J. Genetic analyses of hybrid zones: Number of markers e power of resolution. **Ecology**, v. 78, n. 8, p. 2611-2616, 1997.
- BRADSHAW, H. D.; WILBERT J.R.S.M.; OTTO, K.G.; SCHEM-SKE, D.W. Genetic mapping of floral traits associated with reproductive isolation in monkey flowers (*Mimulus*). **Nature**, v.376, p.762–765. 1995.
- BRASIL. Portaria Nº 57, de 26 de setembro de 2000. Reconhece como RPPN a propriedade da Paroquia de São Miguel, denominada: Nossa Senhora do Oiteiro de Maracaípe no Município de Ipojuca, Estado do Pernambuco. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, n. 187-E, 26 set. 2000. Seção I, p. 98. LSSN 1415-1537.

- CARVALHO, D.A.; OLIVEIRA, E.P.E. Biologia reprodutiva e polinização de *Senna sylvestris* (Vell.) (Leguminosae, Caesalpinioideae). **Revista Brasileira de Botânica**, v.26, p.319–328. 2003.
- Chamaecrista* in Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB82925>>. Acesso em: 01 abr. 2019.
- CHARLES WORTH, D.; WILLIS, J.H. Fundamental concepts in genetics: the genetics of inbreeding depression. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, p. 783-796. 2009.
- COLLEY, E.; FISCHER, M.L. Especiação e seus mecanismos: histórico conceitual e avanços recentes. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v.20, n.04, p.1671-1694. 2013.
- CORREIA, C.L.S.B.; CONCEIÇÃO, A. S. The genus *Chamaecrista* Moench in a fragment of the Ecological Station Raso da Catarina, Bahia, Brazil. **Biota Neotropica**, v.17, n.2. p. 01-16. 2017.
- COSTA, C.B.N.; COSTA, J.A.S.; de QUEIROZ, L.P.; BORBA, E.L. Self-compatible sympatric *chamaecrista* (Leguminosae - Caesalpinioideae) species present different interspecific isolation mechanisms depending on their phylogenetic proximity. **Plant Systematics e Evolution**, v. 299, p. 699-711. 2013.
- COSTA, C.B.N.; LAMBERT, S.M.; BORBA, E.L.; de QUEIROZ, L.P. Postzygotic reproductive isolation between sympatric taxa in the *Chamaecrista desvauxii* complex (Leguminosae-Caesalpinioideae). **Annals of Botany**, v.99, p. 625–635. 2007.
- COZZOLINO S.; NARDELLA, A.M.; IMPAGLIAZZO S.; WIDMER A.; LEXER, C. Hybridization e conservation of mediterranean orchids: should we protect the orchid hybrids or the orchid hybrid zones? **Biological conservation**, v.129, p.14–23. 2006.
- DULBERGER, R. The floral biology of *Cassia didymobotrya* e *C. auriculata* (Caesalpinaceae). **American Journal of Botan**, v.68, p.1350–1360. 1981.
- DUTRA, V.F.; VIEIRA, M.F, GARCIA, F.C.P.; LIMA, H.C. Fenologia reprodutiva, síndromes de polinização e dispersão em espécies de leguminosae dos campos rupestres do parque estadual do itacolomi, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia**, v. 60, p. 371-387. 2009.

- ELLSTRE, N. C.; ELAM, D. R. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. **Annuals Rev. Ecol. Syst.**, v.24, p.217–242. 1993.
- ENDRESS, P.K. **Diversity e evolutionary biology of tropical flowers**. Cambridge University Press, Cambridge. 1994.
- FENSTER, C.B. Mirror image e their effect on outcrossing rate in *Chamaecrista fasciculata* (Leguminosae). **American Journal of Botany**, v.82, p. 46–50. 1995.
- FRANCESCHINELLI, E.V. The pollination biology of two species of *Helicteres* (Malvaceae) with different mechanisms of pollen deposition. **Flora (Jena)**, v. 200, p. 65-73. 2005.
- GOTTSBERGER, G.; SILBERBAUER-GOTTSBERGER, I. Evolution of flower structures e pollination in Neotropical Cassiinae (Caesalpinaceae) species. **Phyton**, v. 28, p.293-320. 1988.
- GOTTSBERGER, G.; SILBERBAUER-GOTTSBERGER, I. **Life in the Cerrado: a South American Tropical Seasonal Vegetation. Vol. II**. Pollination and seed dispersal (First Edition). Reta Verlag, Ulm. 384 p. 2006.
- GOUVEIA, T.M.Z.M.; PINHEIRO, F. Experimentos de cruzamentos recíprocos como ferramenta para avaliar o isolamento reprodutivo numa zona de hibridação natural da família Orchidaceae Juss. **Revista da Biologia**, v. 14, p. 17-23, 2015.
- GREINER, S.; RAUWOLF, U.; MEURER, J.; HERRMANN, R.G. The role of plastids in plant speciation. **Molecular ecology**, v. 20, p. 671– 691. 2011.
- HIRAO A.S.; KUDO G: The effect of segregation of flowering time on fine-scale spatial genetic structure in an alpine-snowbed herb *Primula cuneifolia*. **Heredity**, v.100, p. 424 – 430. 2008.
- IRWIN, H.S.; BARNEBY, R.C. Notes on the generic of *Chamaecrista* Moench (Leguminosae: Caesapinioideae). **Brittonia**, v. 28, p. 28-36. 1976.
- JESSON, L.K.; BARRETT, S.C. H. Experimental tests of the function of mirror-image flowers. **Biological Journal Linnean Society**, v. 85, p. 167-179. 2005.
- JESSON, L.K.; BARRETT, S.C.H. The comparative biology of mirror-image flowers. **International Journal of Sciences**, v.164, n. 05, p.237-249. 2003.

- JOHNSON, N.A. Hybrid incompatibility genes: remnants of a genomic battlefield?. **Trends in genetics**, v. 26, p. 317-325. 2010.
- JUDD, W.S.; CAMPEBELL, C.S.; KELLONG, E.A.; STEVENS, P.F.; DONOGHUE, M. J. **Sistemática vegetal: um enfoque filogenético**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 632. 2009.
- LAPORTA, C. Floral biology e reproductive system of enantiostylous *Senna corymbosa* (Caesalpiniaceae). **Revista de Biologia Tropical**, v.53, n.1-2, p. 49-61. 2005.
- LEVIN, D.A. The origin of reproductive isolating mechanisms in flowering plants. **Taxon**, v. 20, p. 91-113. 1971.
- LEVIN, D.A.; EERSON, W.W. Competition for pollinators between simultaneously flowering species. **American Naturalist**, v. 104, p. 345-354. 1970.
- LEWIS, G.P. Tribe Cassieae. In: Lewis, G.P.; Schrire, B.; Mackinder, B. e Lock, M. (eds.). **Legumes of the world. Royal Botanic Gardens, Kew**. p. 111-125. 2005.
- LEXER, C.; FAY, M.F.; JOSEPH, J.A.; NICA, M.S.; HEINZE, B. Barrier to gene flow between two ecologically divergent *Populus* species, *P. alba* (white poplar) e *P. tremula* (European aspen): the role of ecology e life history in gene introgression. **Molecular Ecology**, v.14, p. 1045–1057. 2005.
- LIU, H.; KOPTUR, S. Breeding system e pollination of a narrowly endemic herb of the Lower Florida Keys: impacts of the urban–wildle interface. **American Journal of Botany**, v. 90, p. 1180–1187. 2003.
- MARAZZI, B.; CONTI, E.; ENDRESS, P. K. Diversity in anthers e stigmas in the buzz-pollinated genus *Senna* (Leguminosae, Cassiinae). **International Journal of Plant Sciences**, v.168, p. 371-391. 2007.
- MARAZZI, B.; ENDRESS, P. K.; Patterns e development of floral asymmetry in *Senna* (leguminosae, cassiinae). **American Journal of Botany**, v. 95, n.1, p. 22–40. 2008.
- MATIAS, R.; OLIVEIRA, A.S.; FURTADO, M.T.; SÁ, T.; RODRIGUES, E.B.; OLIVEIRA, P.E.; CONSOLARO, H. Sistema reprodutivo atípico de duas espécies de Rubiaceae: distília com autoincompatibilidade parcial no morfo brevistilo?. **Rodriguésia**, v. 67, p. 357-368. 2016.

- MATSUMOTO, T.; YASUMOTO, A. A.; NITTA, K.; YAHARA, T.; TACHIDA, H. Difference in flowering time as an isolating barrier. *Journal of Theoretical Biology*, p.317-161-167. 2013.
- MAZZA, M.C.M., J.E.E MAZZA, C.A.S. Fenologia de *Maytenus ilicifolia*. **Revista Brasileira de Botânica.**, v.34, n.4, p.565-574, 2011.
- MORAES, A.P.; CHINAGLIA, M.; PALMA-SILVA, C.; PINHEIRO F. Interploidy hybridization in sympatric zones: the information of *Epidendrum fulgens* x *E. puniceoluteum* hybrids (Epidendroideae, Orchidaceae). **Ecology e evolution**, v. 3, p. 3824-3837. 2013.
- MORELLATO, L.P.C., RODRIGUES, R.R.; LEITÃO FILHO, H.F. E JOLY, C.A. Estudo comparativo da fenologia de espécies arbóreas de floresta de altitude e floresta mesófila semidecídua na Serra do Japi, Jundiá, São Paulo. **Revista Brasileira de Botânica**, v.12, p.85-98. 1989.
- MURCIA, C. **Forest fragmentation e the pollination of neotropical plants**. In: SCHELLAS J.; GREENBERG, R. (eds.). *Forest patches in tropical landscapes*. Isle Press, London, p. 19-36. 1995.
- OLIVEIRA, P.E.; MARUYAMA, P.K. Sistemas Reprodutivos. In: RECH, A.; AGOSTINI, K; OLIVEIRA, P.E.; MACHADO, I.C. (Orgs.). **Biologia da Polinização**. RJ: Projeto Cultural, 1ed. v. 1, p. 70-92. 2014.
- QUEIROZ, K. **The general lineage concept of species, species criteria, e the process of speciation: A conceptual unification e terminological recommendations**. In: HOWARD, D.J.; BERLOCHER, S.H. (eds.). *Endless forms: Species e speciation*, Oxford: Oxford University Press, p. 57-75. 1996.
- RAMSEY J.; BRADSHAW H.D., SCHEMSKE D.W. Components of reproductive isolation between the Monkeyflowers *Mimulus lewisii* e *M. cardinalis* (Phrymaceae). **Evolution**, v.57, p.1520-1534. 2003.
- RIBEIRO, R.A.; LOVATO, E M. B. Mating system in a neotropical tree species, *Senna multijuga* (Fabaceae). **Genetics e Molecular Biology**, v. 27, n.03, p. 418-424. 2004.
- ROBERTSON, C. Flowers e insects. **Botanical Gazette**, v.15, p. 199-204. 1890.

SAKAI, S.; WRIGHT, S.J. Reproductive ecology of coexisting Psychotria species (Rubiaceae): when is heterostyly lost?. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 93, p. 125-134. 2008.

SCOPECE, G.S.; COZZOLINO, S.D.J.; SCHIESTL, F.P. Pollination efficiency e the evolution of specialized deceptive pollination systems. **American Naturalist**, v. 175, p. 98–105. 2010.

THORP, R.W.; ESTES, J.R. Intrafloral behavior of bees on flowers of *Cassia fasciculata*. **Journal of the Kansas Entomological Society**, v. 48, p. 175-184. 1975.

TODD, J.E. On the flowers of *Solanum rostratum* e *Cassia chamaecrista*. **American Naturalist**, v. 16, p. 281-287. 1882.

CAPÍTULO 1

BARREIRAS DE ISOLAMENTO REPRODUTIVO INTERESPECÍFICO EM *Chamaecrista* Moench. (FABACEAE- CAESALPINIOIDEAE)

Manuscrito a submetido ao periódico *Botanical Journal of the Linnean Society*

**BARREIRAS DE ISOLAMENTO REPRODUTIVO EM *Chamaecrista* Moench.
(FABACEAE- CAESALPINIOIDEAE)**

Thatiany Teixeira Bezerra¹; Maciano Andrade Santos²; Cibele Cardoso Castro^{1,3} & Natan
Messias Almeida^{1,2*}

¹ Programa de Pós-graduação em Botânica, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Avenida Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE. 52171-900, Brasil.

² Universidade Estadual de Alagoas, Campus III, Rodovia AL-115, km 03, Palmeira dos Índios, AL. 57.312-270, Brasil.

³ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Avenida Bom Pastor, s/n, Boa Vista, Garanhuns, PE. 55292-270, Brasil.

Título resumido: Isolamento reprodutivo em *Chamaecrista*

* Autor para correspondência: Tel .: +5581998025118. E-mail: natan.almeida@uneal.edu.br (N.M. Almeida).

RESUMO: Híbridos são descendentes do cruzamento interespecíficos cujas barreiras reprodutivas estão fragilizadas ou não estão completamente estabelecidas. A hibridização é particularmente comum em certos gêneros da família Fabaceae. Na RPPN Nossa Senhora do Oiteiro de Maracaípe, PE, ocorrem em sincronopatria cinco espécies irmãs do gênero *Chamaecrista*: *C. ramosa*; *C. rotundifolia*; *C. rotundifolia* var. *rotundifolia*; *C. hispidula* e *C. flexuosa*. Neste trabalho avaliamos as barreiras e a intensidade do isolamento reprodutivo pré e pós-zigóticos entre estas espécies. Utilizando experimentos de polinização recíproca foi possível detectar hibridização entre as espécies testadas em níveis distintos e independentes em espécies com sobreposição na floração. Constatamos que apenas cinco cruzamentos apresentaram formação de frutos maior que 50%, neste caso, o baixo sucesso reprodutivo nos tratamentos é uma importante barreira reprodutiva que promove isolamento reprodutivo forte o suficiente para manter a coesão destas espécies. Apesar da partilha de visitantes ocorrer, a barreira morfológica se torna a mais eficiente entre as barreiras pré-zigóticos.

Palavras-chave: Barreiras reprodutivas; Híbridos; Fluxo gênico; Enantioestília.

ABSTRAT Hybrids are descendants of interspecific crosses and reproductive barriers are fragile or not completely free. Hybridization is typically common in certain genera of the

Fabaceae family. In the RPPN Our Lady of the Eight of Maracaípe, PE, next in relation to five sister species of the genus *Chamaecrista*: *C. ramosa*; *C. rotundifolia*; *C. rotundifolia* var. *rotundifolia*; *C. hispidula* and *C. flexuosa*. This work evaluates the barriers and the intensity of the pre- and post-zygote reproductive isolation between these species. By using reciprocal pollination experiments it was possible to detect hybridization between species tested in different quantities and insects in species with overlap in flowering. We found that only five crosses were fruit formation greater than 50%, otherwise, reproductive success in the tests is an important reproductive barrier that promotes the reproductive isolation strong enough to maintain a cohesion with the species. Although the sharing of visitors occurs, the morphological barrier becomes more efficient between pre-zygotic barriers.

Keywords: Reproductive barriers; hybrids; gene flow; Enantiostyle.

INTRODUÇÃO

O isolamento reprodutivo envolve diversas barreiras que atuam em diferentes etapas da reprodução, podendo ser pré-zigóticas e pós-zigóticas (Ellstre et al., 1996; Scopece et al., 2010). No primeiro, destacam-se diferenças em épocas de floração, não compartilhamento de agentes polinizadores, deposição de pólen em locais diferentes do corpo dos polinizadores (Endress, 1994; Franceschinelli, 2005), e sistemas de incompatibilidade interespecífico que atuam na germinação do pólen no estigma (Bradshaw et al., 1995), na singamia (Lexer et al., 2005) e na formação de frutos e/ou de sementes. Entre as barreiras pós-zigóticas estão a inviabilidade e a esterilidade e/ou a redução do desempenho reprodutivo dos híbridos (Levin, 1971; Judd et al., 2009, Johnson, 2010; Greiner et al., 2011), ou até seleção da progênie, envolvendo o aborto seletivo e a alocação diferencial de recursos.

Dentro do grupo taxonômico *Chamaecrista* existem espécies relacionadas e com sincronia na floração e simpatria, o que possibilita a partilha ou competição de visitantes florais (Costa et al., 2013; Correia e Conceição, 2017). A partilha de polinizadores entre espécies relacionadas pode causar impacto negativo na reprodução das populações naturais de plantas e até mesmo resultar em hibridização, enquanto, a competição, pode interferir no número de

polinizadores e de visitas às flores e levar os indivíduos vegetais ao isolamento reprodutivo (Murcia, 1995).

Diversas espécies de *Chamaecrista* apresentam enantioestilia, que se caracteriza por ser um polimorfismo floral com ocorrência de morfos florais recíprocos no indivíduo (monomórfica) ou em indivíduos distintos (dimórfica), os quais diferem entre si pelo posicionamento do gineceu em relação ao eixo floral, podendo estar à direita ou esquerda (Jesson e Barrett, 2002). Almeida e colaboradores (2015a) descreveram diferentes tipos enantioestílicos em espécies da subtribo Cassiinae (*Cassia*, *Senna* e *Chamaecrista*). As características observadas pelos autores, para diferenciação dos tipos, referem-se basicamente a forma e aos locais de deposição e captação do pólen no corpo dos polinizadores, que podem garantir elevações nas taxas de xenogamia.

Diferenças mecânicas nas flores, além de elevarem as taxas de xenogamia, podem ser cruciais para evitar a hibridação (Barrett, 2002). Os tipos enantioestílicos presentes em Cassiinae, podem promover uma barreira morfológica muito forte, através da deposição e captação de pólen em diferentes locais do corpo dos polinizadores, com vantagens adaptativas capazes de garantir o sucesso reprodutivo (Almeida et al. 2015a). Além disso, a barreira morfológica é eficaz no direcionamento da deposição dos grãos de pólen no momento da visita no corpo das abelhas, deste modo, minimiza a perda de pólen por pilhadores e maximiza a dispersão dos mesmos (Westerkamp 1997; Hargreaves et al., 2009; De Luca e Vallejo-Marín, 2013).

O entendimento do processo de especiação envolve a determinação de quais barreiras reprodutivas estão envolvidas na redução do fluxo gênico entre populações de mesma espécie e o entendimento de quais forças evolutivas as produzem (Nosil e Crespi, 2006). Em *Chamaecrista*, alguns grupos apresentam delimitação taxonômica bastante confusa, devido à sobreposição de caracteres morfológicos das espécies, sugerindo a presença de zonas híbridas interespecíficas (Conceição, 2006, Costa *et al.*, 2007). Por outro lado, outros autores descrevem, a barreira reprodutiva morfológica-funcional como um mecanismo que propõe atuar como importante obstáculo para formação de híbridos naturais em populações enantioestílicas de *Chamaecrista*.

Compreender como atua o fluxo gênico intra e, principalmente, interespecífico na manutenção da integridade e coesão das espécies é um tema de grande interesse. Mesmo não sendo comum, existem relatos da ocorrência da formação de híbridos naturais em espécies de

Chamaecrista (Conceição, 2006). Sendo assim, este estudo teve como objetivo investigar a existência e diversidade de barreiras de isolamento reprodutivo entre espécies enantioestílicas e sincropátricas do gênero *Chamaecrista*, norteando-se na seguinte hipótese: Barreiras reprodutivas morfológicas são ocorrentes e suficientes para promover o isolamento entre espécies sincronopátricas de *Chamaecrista*.

MATERIAL E MÉTODOS

Local de estudo

O estudo foi conduzido em vegetação de restinga situada na Reserva Particular do Patrimônio Natural de Nossa Senhora do Oiteiro de Maracápe, município de Ipojuca, PE, Brasil (08° 831' 48" 'S; 35° 801' 05"W). A reserva abrange 76,2 hectares, incluindo 80% de restinga e 20% de mangue ((Brasil, 2000; Almeida et al., 2013a;b). O clima é tropical, quente e úmido (Koppen, 1948), as temperaturas médias anuais são 27°C e precipitação de 2000 mm/ano, com maior intensidade entre junho e agosto (Inmet, 2017).

Espécies do estudo

Foram estudadas cinco espécies de *Chamaecrista* Moench. (Fabaceae): *i) C. ramosa* (Vogel) H.S.Irwin & Barneby; *ii) C. rotundifolia* (Pers.) Greene.; *iii) C. rotundifolia* var. *rotundifolia* (Pers.) Greene.; *iv) C. hispidula* (Vahl) H.S.Irwin & Barneby; e *v) C. flexuosa* (L.) Greene (classificada como enantioestílica atípica por apresentar três morfos florais segundo Almeida et al., 2013b). As espécies possuem antese diurna, classificadas como enantioestílicas monomórficas, com hábito subarborescente ou herbáceo, terrícolas, ocorrendo em áreas abertas da reserva (Almeida et al., 2015a).

Isolamento reprodutivo

Para testar a hipótese de que a barreira morfológica é a que atua fortemente no isolamento reprodutivo entre as espécies estudadas, foram conduzidos experimentos que envolvessem barreiras temporal, espacial, fisiológica e morfológica. Foram feitas as seguintes observações/experimentos:

a) *Distribuição espacial das populações/indivíduos (barreira espacial)*

As populações/indivíduos de cada espécie foram georreferenciadas através do uso de GPS, possibilitando o conhecimento da localização exata e do distanciamento preciso entre eles. Foram marcados e monitorados 21 pontos de acompanhamento mensal das populações naturais distribuídas na área da reserva, em cada população foi marcado um ponto central e buscou-se as espécies dentro deste raio, cada raio com diâmetro de 20m.

b) *Período de floração (barreira temporal)*

Em campo foram realizadas visitas mensais, pelos pontos de distribuição espacial das espécies na área de estudo, para observar o índice de atividade de indivíduos em floração (emissão de botões ou de flores abertas) e o índice de intensidade no nível de agrupamentos, seguindo Fournier, (1974 com modificações). Os valores foram obtidos em campo através de uma escala intervalar semi-quantitativa de cinco categorias (0 a 4) e intervalo de 25% entre cada categoria (a partir da 1) podendo chegar a 100%. As fases fenológicas observadas foram: floração- emissão de botões ou de flores em antese (flores abertas).

c) *Formação de híbridos (barreira fisiológica)*

c.1. Cruzamentos bidirecionais

As flores foram isoladas com sacos de *voil*, em pré-antese e posteriormente aos cruzamentos em todos os tratamentos, permanecendo desde o período funcional das flores até o amadurecimento dos, logo após os sacos foram retirados e os frutos coletados e identificados. Foram feitos cruzamentos entre espécies que apresentaram sobreposição de floração. Os cruzamentos foram realizados de forma bidirecional interespecífica para todos os táxons. O número de flores usadas por tratamento e por indivíduo não foi uniforme, devido a diferenças na disponibilidade de flores em diferentes indivíduos, sendo os cruzamentos realizados de forma aleatória (Almeida et al., 2015b; Costa et al., 2013).

c.2. Testes de germinação

Todos os frutos formados foram contabilizados e suas sementes testadas quanto ao potencial germinativo. As amostras foram misturadas, retirando-se sub-amostras aleatórias para

os testes. As sementes foram lixadas, embebidas em água destilada por 2h, posteriormente, colocada para germinar em duas folhas de papel germitest, umedecidas com água e colocadas em bandejas de plástico transparentes, sendo acondicionadas em temperatura ambiente de cerca de 28°C em casa de vegetação (Maia et al., 2010; Nascimento et al., 2012). A germinação foi definida como o momento em que a ponta da radícula emergiu ≥ 1 mm do tegumento. Foram calculadas a germinabilidade (G %), em avaliações realizadas diariamente por um período de acompanhamento por 10 dias.

d) Partilha dos visitantes florais (barreira ecológica)

A partilha de visitantes florais entre as espécies *C. ramosa*, *C. flexuosa* foi analisada através da literatura, pela consulta de artigos publicados com dados de estudos anteriores realizados com as espécies na mesma área de estudo (Almeida et al., 2013a; 2013b; 2015b). Além disso, foram realizadas observações diretas em plantas focais das 5:30h às 11:30h, em diferentes dias, totalizando 80 horas de acompanhamento, para as espécies *C. hispidula*, *C. rotundifolia* var. *rotundifolia*. e *C. rotundifolia*, durante o período de agosto (2017) à agosto de (2018).

e) Tipos Enantioestílicos (barreira morfológica)

Os Tipos Enantioestílicos das espécies estudadas foram definidos pela consulta à publicação de Almeida e colaboradores (2015a). Esta classificação tem relação com a análise da existência de uma barreira morfológica das flores. O enquadramento das espécies estudadas nos tipos enantioestílicos dependeu da observação de cinco características morfo/funcionais, sendo as principais relacionadas aos locais de deposição e captação do pólen no corpo dos polinizadores.

(i) Local de deposição - deposição e captura de pólen sobre o dorso ou o ventre dos polinizadores; (ii) Reciprocidade - pólen depositado pelas anteras no mesmo lado do contato com o estigma (não recíproco) ou no lado oposto (recíproco); (iii) Modo de deposição - depósito de pólen no corpo do polinizador feito diretamente pelas anteras (diretas) ou por uma ou mais pétalas (indiretas); (iv) Número de pétalas envolvidas com a deposição de pólen - nenhuma ou uma pétala toca o polinizador no local que é oposto ao contato com o estigma (um), ou mais de uma pétala toca o polinizador no lado oposto ao contato pelo estigma (grupo); e (v) Via de

pólen - a deposição de pólen pode ser feita pelas anteras (diretas) ou mediada por uma pétala ou um grupo de pétalas (indiretas).

ANÁLISE DE DADOS

Foi aplicado o teste de χ^2 (qui-quadrado) para avaliar a diferença no número de frutos formados entre os cruzamentos bidirecionais e também a relação entre pares nos cruzamentos recíprocos. Os testes foram realizados utilizando o software R versão 3.4.3 (R Development Core Team, 2017).

RESULTADOS

a) Distribuição espacial das populações (barreira espacial)

A espécie *C. flexuosa* possui distribuição mais abrangente (figura 2), ocorrendo em áreas abertas na maior parte da área da RPPN. De todas as espécies, é a que possui maiores distâncias entre indivíduos (intraespecífica), tanto com relação aos indivíduos nos agrupamentos ocorrendo mais isoladamente, quanto entres manchas da própria espécie (1000,68m). *Chamaecrista flexuosa* apresenta sobreposição de hábitat nos pontos 1 e 18 com *C. hispidula*, *C. rotundifolia var rotundifolia* e 14 com *C. ramosa*.

As menores distâncias tanto intra como interespecíficas, ocorreram nas espécies *C. hispidula* e *C. rotundifolia var rotundifolia*. Todos os pontos de ocorrência das espécies estavam sobrepostos e seus indivíduos agrupados nas manchas, de modo similar ao observado com *C. rotundifolia* e as espécies supracitadas (76m; do ponto 1 para o 2; fig. 2).

As maiores distâncias entre as espécies são encontradas nos agrupamentos envolvendo *C. hispidula*, *C. rotundifolia var rotundifolia* e *C. rotundifolia* (18) com *C. flexuosa* (5) apresentando 932,05m e *C. ramosa* (17) e *C. flexuosa* (5) com 818,84m de distância.

Os agrupamentos de *C. ramosa* são contínuos aglomerados e isolados das outras espécies, compartilhando ambiente apenas com *C. flexuosa* (14) a qual tem baixa abundância de indivíduos reprodutivos, e ainda, apresenta distribuição disjunta nesta área.

Em relação a abundância dos indivíduos reprodutivos por agrupamento, observamos que 76% (n=16) possuem de 0-50 de plantas por agrupamento. *Chamaecrista ramosa* possui manchas incluídas nas categorias 1-50 (n=8) e 51-100 (n=3) indivíduos; *C. flexuosa* 1-50 (n=7) e 101-200 (n=1); *C. rot. var. rotundifolia* 1-50 (n=1), 51-100 (n=1) e 101-200 (n=1); e *C. rotundifolia* tem agrupamentos incluídos nas categorias 51-100 (n=1) e 201-300 (n=1).

As populações com maior número de indivíduos reprodutivos ocorrem para *C. rotundifolia*, onde 50% dos agrupamentos estão na categoria (201-300). Em seguida de *C. hispidula* (100%), *C. rot. var. rotundifolia* (25%) e *C. flexuosa* (10%) incluídas em manchas de 101-200 indivíduos reprodutivos e estas espécies caracterizam-se por ocorrer sempre nos mesmos habitats e com indivíduos concentrados em manchas adensadas e delimitadas, com exceção da última.

b) Período de floração (barreira temporal)

O grau de intensidade de floração, durante o período avaliado, mostrou-se variável entre as espécies de *Chamaecrista* (fig.3). As espécies *C. ramosa* e *C. flexuosa* com estratégias temporais semelhantes florescem o ano todo, em relação ao período de maior atividade reprodutiva ocorrendo após o período chuvoso. *C. flexuosa* apresenta pico de floração em agosto e *C. ramosa* entre novembro e dezembro.

Em agosto houve máxima na floração de todas as espécies (100%) exceto *C. ramosa* (25%) com expressão mínima de recursos. Em setembro todas as espécies apresentaram redução na floração, no qual *Chamaecrista rotundifolia* e *C. flexuosa* reduziram em 25% a intensidade. Em outubro, a floração em *C. hispidula* persistiu por duas semanas. *C. rotundifolia* e *C. rotundifolia* var. *rotundifolia* apresentaram suspensão da floração logo no início da estação seca.

De janeiro a março de 2018 com apenas duas espécies floridas (*C. ramosa* e *C. flexuosa*), verificou-se, a oferta mínima de recursos, com *display* floral variando no máximo de 25-50% nos agrupamentos. Em abril, houve o reinício da fase de floração de todas as espécies da reserva, destacando-se a definição de duas estratégias distintas ocorrendo nesse momento: *C. rotundifolia* e *C. ramosa* deram início à fenofase com 75% de indivíduos floridos, demonstrando um maior investimento, por outro lado, *C. rotundifolia* var. *rotundifolia* e *C.*

hispidula com 25%, apresentaram aumento triplicado da floração em relação ao mês anterior, que se manteve com atividade máxima nos próximos dois meses.

c) Formação de híbridos (barreira fisiológica)

c.1 Cruzamentos bidirecionais

Os cruzamentos realizados estão listados na Tabela 1. Verifica-se que todos os cruzamentos formaram frutos, com exceção de *C. flexuosa* (receptora) x *C. rotundifolia* var. *rotundifolia* (doadora). Entretanto, apenas cinco cruzamentos apresentaram formação superior a 50%.

Avaliando a associação existente entre variáveis pré-reprodutivas quantificadas, verificamos que não há proporção entre os tratamentos, sendo a quantidade de frutos variável entre os cruzamentos. Logo, as variáveis são independentes ($X^2 = 127.32$ gl = 3,8; $p < 0,01$). Entretanto, entre os cruzamentos bidirecionais verifica-se que exista uma associação de proporcionalidade, assim, entre as duplas existe uma estreita relação em comum na produção de frutos (gl=1; $p > 0,5$).

O sucesso pré-reprodutivo mais expressivo foi de 80% para *C. rotundifolia* (receptora) x *C. rot. var. rotundifolia* (doadora). A formação de frutos maiores que 70% ocorreu, respectivamente, nos cruzamentos *C. rotundifolia* (receptora) x *C. ramosa* (doadora) e *C. ramosa* (receptora) x *C. hispidula* (doadora). Cruzamentos considerados com baixa formação de frutos (5-18%) ocorreram entre *C. hispidula* (receptora) x *C. rotundifolia* (doadora), *C. flexuosa* (receptora) x *C. hispidula* (doadora) e *C. flexuosa* (receptora) x *C. ramosa* (doadora) e não compatível, ou seja, nulo entre *C. flexuosa* (receptora) x *C. rot. var. rotundifolia* (doadora).

Em alguns casos houve deficiência no número de sementes, por abortos ou má formação dos frutos ocasionados anteriormente a maturação. Para os cruzamentos *C. rotundifolia* x *C. hispidula* e *C. hispidula* x *C. rotundifolia* var. *rotundifolia*, 58,3% e 41,6% dos frutos, respectivamente foram considerados mal formados (considerando àquelas defeituosas, danificadas, fora do padrão de tamanho e forma descrito para o gênero). Destaca-se o aborto elevado dos frutos no cruzamento bidirecional envolvendo *C. flexuosa* como receptora de pólen (95%) e *C. ramosa* como receptora (89,5%) e, considerado uniforme e ocorrendo num prazo curto, por volta de 5 a 10 dias após a polinização das flores. Foi constatado também a presença apenas de uma semente desenvolvida por fruto, por exemplo, ocorrendo *C. ramosa* x *C.*

rotundifolia. De modo mais drástico em *C. flexuosa* x *C. hispidula*, o único fruto formado foi abortado.

c.2 Testes de germinação

A germinação de sementes provenientes dos cruzamentos interespecíficos ocorreu em 14 (70 %) dos 20 cruzamentos realizados. Em seis dos cruzamentos interespecíficos, 30% não ocorreram germinação das sementes, na maioria envolvendo *C. flexuosa*.

O menor percentual de germinabilidade (G=8-24%) foi observado nos cruzamentos envolvendo as espécies *C. ramosa* e *C. hispidula*. O mesmo foi observado nas sementes oriundas dos cruzamentos entre *C. rot. var. rotundifolia* x *C. rotundifolia* (G=32%) e *C. rot. var. rotundifolia* x *C. flexuosa* (G=28%).

Em contrapartida, as maiores porcentagens de germinação foram observadas nos cruzamentos entre *C. rot. var. rotundifolia* x *C. hispidula* (G=100%), *C. hispidula* x *C. rotundifolia* (G=85,7%), *C. rotundifolia* x *C. ramosa* (G=84%) e *C. hispidula* x *C. rotundifolia var. rotundifolia* (G=83,3).

Após a geração dos frutos, analisamos a etapa pós-reprodutiva, na germinação, os resultados apresentam mecanismo de barreira na formação de sementes viáveis de modo unilateral nos cruzamentos entre *C. ramosa* x *C. rotundifolia*, *C. hispidula* x *C. flexuosa* (bidirecional), *C. ramosa* x *C. flexuosa* (bidirecional) e *C. flexuosa* x *C. rot. var. rotundifolia* (unidirecional), desta forma, a ocorrência do aborto ocasiona a interrupção da formação da plântula híbrida.

d) Partilha de visitantes florais (barreira ecológica)

A busca na literatura e adicionalmente as observações em campo, mostraram a ocorrência de 11 espécies de abelhas visitando flores das espécies estudadas. Quatro espécies de abelhas visitaram apenas uma espécie de *Chamaecrista*, como exemplo, *Centris* sp.1 e *Xylocopa grisescens* só visitaram flores de *C. flexuosa*, já *Centris* sp. 2, *Triepeolus* sp. e *Neoxylocopa* sp. visitaram apenas flores de *C. ramosa*.

As abelhas frequentes foram registradas ocorrendo em quatro espécies de *Chamaecrista* (tabela 2). *Augochlora* sp. visitou todas com exceção de *C. flexuosa*, *Eufrisea* sp., com exceção de *C. rotundifolia* e *Florilegus* sp. com exceção de *C. hispidula*. *Chamaecrista ramosa* apresentou maior diversidade de visitantes (n=8). *Florilegus* sp. visitou flores de *C. ramosa*, *C. rotundifolia* e *C. rotundifolia* var. *rotundifolia*. *Xylocopa carbonaria* e *X. cearensis* foram observadas visitando flores de *C. flexuosa* e *C. ramosa*. A abelha *X. frontalis* foi observada visitando flores de *C. rotundifolia* e *C. rot. var. rotundifolia*.

e) *Tipos enantiofilicos (Barreira morfológica)*

A análise das características morfo-funcionais de similaridade das flores das cinco espécies estudadas permitiu o reconhecimento de três tipos enantiofilicos: Tipos Flexuosa, Amiciella e Ramosa (Almeida et al., 2015a). As informações apresentadas na tabela 3, sintetizam os resultados para compreensão geral das barreiras reprodutivas observadas.

Constatamos que a espécie *C. flexuosa* enquadra-se no Tipo Flexuosa, o qual apresenta como características ausência de reciprocidade das anteras e deposição de pólen direta e esternotribica. *C. hispidula* é classificada no Tipo Amiciella, onde ocorre reciprocidade e o depósito do pólen é feito de forma indireta e nototribica, através de uma pétala modificada. As espécies *C. ramosa*, *C. rotundifolia* e *C. rotundifolia* var. *rotundifolia* pertencem ao Tipo Ramosa, apresentando deposição de pólen indireta e nototribica, realizada por um conjunto de pétalas, além de apresentarem reciprocidade.

DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram que a hipótese foi confirmada. Dentre as barreiras reprodutivas estudadas, a barreira morfológica-funcional das flores se destaca como principal barreira pré-zigótico, presente em *Chamaecrista* e sendo suficiente para promover o isolamento entre espécies sincronopátricas. Desta forma, a complexidade morfológica relacionada ao polimorfismo, se estende as suas conhecidas funções e revela-se como um atributo ecológico importante para o isolamento reprodutivo interespecífico e manutenção

dessas espécies (Almeida et al., 2015a). No estudo aqui apresentado, o isolamento reprodutivo é mantido naturalmente, evidenciado pela ausência de híbridos na área da reserva.

Nas condições observadas, apesar do isolamento, o padrão de distribuição espacial juntamente com o padrão de floração, possivelmente atuam no enfraquecimento das barreiras do isolamento reprodutivo, ineficientes para o impedimento do fluxo polínico interespecífico. Segundo Pinheiro et al. (2013), em plantas é comum que espécies filogeneticamente relacionadas, ocorrendo numa mesma localidade, experimentem fluxo de pólen interespecífico, o que pode levar a formação de híbridos.

Além disso, agrupamentos aglomerados são esperados em *Chamaecrista*, no qual o amadurecimento dos frutos e a torção das valvas expulsam as sementes a pequenas distâncias caracterizando a autocoria (Rando e Pirani, 2011). A ausência de barreiras geográficas e a comum oferta de recurso (pólen) possibilita o fluxo gênico interespecífico. Estas características reduzem as barreiras para a ocorrência da hibridização, já que o grau de isolamento reprodutivo tende a aumentar conforme a distância entre as populações.

Costa et al. (2013) constaram que oito espécies simpátricas de *Chamaecrista* apresentaram diferentes estratégias de floração, com padrão anual e contínuo. Destacamos que em nossos resultados o isolamento parcial da floração ocorre para *C. ramosa* e *C. flexuosa*, e o isolamento temporal completo não ocorre em nenhuma das espécies. A autora supracitada, detectou isolamento temporal completo de floração entre *C. rotundifolia* var. *grandiflora* e *C. confertiflormis*, além de isolamento parcial, com pequena sobreposição, entre esta última e *C. blanchetii*, sendo esta sobreposição suficiente para ocasionar a formação de híbridos naturais que tem sido reportada entre estas espécies, ocasionando *C. blanchetiformis* (Conceição, 2006).

Além disso, na família Fabaceae existem outros relatos de hibridização em diversos gêneros, como *Bauhinia* (Lau et al., 2005), *Parkinsonia* e *Cercidium* (Hawkins et al., 1999), *Baptisia* (Alson e Turner, 1963) entre outras espécies pertencentes a *Chamaecrista* (Conceição, 2006). Nestes táxons de *Chamaecrista*, a ocorrência de sementes abortadas sugere, à primeira vista, a presença de alelos recessivos letais como as causas mais prováveis para a baixa frutificação encontrada entre os táxons, ocasionando depressão endogâmica (Costa et al., 2013).

Os resultados apresentados dos tratamentos de polinização cruzada interespecífica indicam em níveis distintos compatibilidade entre as espécies de *Chamaecrista*, e apenas, irrestrita incompatibilidade entre *C. flexuosa* (receptora) x *C. rotundifolia* var. *rotundifolia* (doadora) apresentando barreira no mecanismo fisiológico pré reprodutivo.

A inviabilidade da semente é a principal barreira de isolamento pós-zigótico encontrado para as espécies estudadas. Neste caso, o baixo sucesso reprodutivo dos híbridos formados nos cruzamentos é uma importante barreira que promove isolamento reprodutivo. Estas barreiras atuam de maneira sobreposta, atuando como um filtro que confere o isolamento reprodutivo entre os táxons de *Cassiinae*.

A autocompatibilidade relatada para as *Chamaecrista* estudadas (Almeida et al 2013a,b; Almeida et al., 2015b) indica ser uma característica comum ao gênero (Gottsberger e Silberbauer-Gottsberger, 1988; Fenster, 1995; Liu e Koptur, 2003; Costa et al., 2007). Espécies autocompatíveis podem apresentar redução na variabilidade genética, mas a autocompatibilidade pode ser considerada uma barreira de isolamento reprodutivo na presença de fluxo de pólen interespecíficos, dificultando a formação de híbridos e promovendo o desenvolvimento de indivíduos férteis e viáveis (Matallana et al., 2010). Isto ocorre, devido a possibilidade de formação de frutos por autopolinização, conduzindo a um aumento na competição pela área do estigma com pólen de outras espécies.

Barreiras pós-zigóticas incluem inviabilidade e a esterilidade e/ou a redução do desempenho reprodutivo dos híbridos (Greiner et al., 2011), ou até mesmo serem seletivas através de barreiras pós-zigóticas que selecionam a progênie, os quais envolvem o aborto seletivo e a alocação diferencial de recursos. O estudo das barreiras reprodutivas entre espécies que se encontram em tais condições promove, portanto, o entendimento de processos que norteiam a especiação (Colley e Fischer, 2013). Apesar das espécies estudadas de *Chamaecrista* possuírem floração sobreposta e com agrupamentos próximos, a competição por polinizadores não parece ser uma pressão seletiva forte que atue na diferenciação do período de floração, corroborando com outros estudos (Costa et al., 2013).

Em nossos resultados verificamos que 40% dos visitantes interagem exclusivamente com uma espécie de *Chamaecrista*. Além disso, as abelhas *Augochlora* sp., *Florilegus* sp. e *Eufrisea* sp. registam comportamento generalista, sendo frequentes em quatro espécies de *Chamaecrista*. Rezende et al. (2003), afirmam que a partilha de polinizadores entre espécies sincronopátricas pode acarretar em polinização interespecífica. Entretanto, verificamos que tanto *Augochlora* sp. como *Florilegus* sp. são consideradas polinizadoras efetivas em espécies que possuem tipos morfológicos distintos (tab.2), conseqüente, a barreira morfológica nesses casos atua naturalmente no impedimento do fluxo polínico.

Particularmente, *Eufrisea* sp. é a única das abelhas analisadas que compartilha quatro espécies de *Chamaecrista* e atuam na polinização nos três tipos morfológicos aqui estudados.

Nesse caso, indica uma fragilidade na barreira morfológica e ecológica o que poderia ocasionar o fluxo interespecífico entre *C. ramosa* x *C. rotundifolia* var. *rotundifolia*. No entanto, a barreira temporal se faz presente e efetiva, já que *C. rotundifolia* var. *rotundifolia* encontra-se em maior atividade de floração em agosto, quando o *display* floral de *C. ramosa* está minimizado (25%). Por outro lado, *C. ramosa* possui pico de floração entre novembro e dezembro e nesse momento *C. rotundifolia* var. *rotundifolia* encontra-se ausente ou vegetativa no ambiente (fig.3).

A identificação dos tipos enantiostílicos com diferentes níveis de complexidade reflete a diversidade morfológica das flores de Cassiinae e representa estratégias distintas de captura e deposição de pólen no corpo do polinizador (Irwin e Barneby, 1982; Dulberger et al., 1994; Marazzi et al., 2006, 2007; Marazzi e Endress, 2006; Almeida et al., 2013a; Almeida et al., 2013b). Alguns dos tipos enantiostílicos são relacionados às estratégias incomuns da deposição do pólen no corpo do polinizador como em *C. flexuosa*.

A principal barreira existente (tabela 3) é a relacionada ao tipo enantiostílico, sendo encontrado três tipos diferenciados, o Tipo Ramosa, Tipo Flexuosa e o Tipo Amiciella. Espécies de tipos diferentes a morfologia floral indica depósito e captura do pólen em locais distintos. Espécies que coincidem os tipos, como *C. ramosa* e *C. rotundifolia* (Tipo Ramosa), apresentam tamanhos de flores, período de floração e distribuição diferentes.

Com relação aos tamanhos florais deste Tipo, *C. ramosa* possui tamanho médio de 22,5mm, *C. rotundifolia* 9,98mm e *C. rot. var. rotundifolia* com 9,74mm, todas do Tipo Ramosa. As demais espécies apresentam tamanho médio das flores, dentro do Tipo Amiciella: *C. hispidula* 20mm (Queiroz, 2009). E o Tipo Flexuosa: *C. flexuosa* (22,1mm). O que resulta em locais de deposição e captação distintos, mesmo em tipos iguais, há redução da possibilidade de partilha de polinizadores e, conseqüentemente, dificuldades no fluxo de pólen entre as espécies.

A formação de frutos em alguns tratamentos indica potencial de hibridização, porém, esta foi facilitada somente após as polinizações experimentais, mostrando que a barreira morfológica está funcionando de modo natural. A barreira pós reprodutiva também foi registrada, sendo relacionada a inviabilidade das sementes híbridas, indicado nos cruzamentos entre *C. flexuosa* x *C. hispidula* e *C. flexuosa* x *C. ramosa* de modo bidirecional, restringindo a possibilidade de existir híbridos naturais entre estes táxons.

CONCLUSÃO

Em conclusão, consideramos que barreiras ecológicas associadas a morfologia floral e na relação da interação planta polinizador possam trazer a compreensão da ocorrência de barreiras de isolamento reprodutivo entre espécies simpáticas através de barreiras pré e pós-zigóticas. As espécies estudadas apresentam uma diversidade dessas barreiras que atuam regulando ou impedindo o fluxo gênico interespecífico. Permitindo caracterizar as espécies estudadas como sincronopátricas com distribuição geográfica e períodos de floração em comum. As espécies *C. ramosa* e *C. flexuosa* florescem o ano todo, com estratégias semelhantes em relação ao período de maior atividade reprodutiva. Apesar da partilha de visitantes ocorrer em algumas espécies a barreira morfológica se torna a mais eficiente entre as barreiras pré-zigóticas. O baixo potencial germinativo, ou até inviabilidade na etapa de germinação é indicado como principal barreira pós-zigótico de isolamento, com resultados superiores a 50% de produção de plântulas em apenas nove dos vinte tratamentos realizados, e com inviabilidade do embrião em 30% dos casos.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela bolsa concedida à primeira autora, ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal Rural de Pernambuco (PPGB) e ao Laboratório de Ecologia Reprodutiva (LERA/UFRPE) pelo apoio logístico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, N.M.; de CASTRO, C.C.; de LIMA LEITE, A.V.; NOVO, R. R.; MACHADO, I.C. Enantiostyly in *Chamaecrista ramosa* (Fabaceae-Caesalpinioideae): floral morphology, pollen transfer dynamics and breeding system. **Plant Biology (Stuttgart)**, v. 15, p. 369-375, 2013a.

ALMEIDA, N.M.; CASTRO, C.C.; LEITE, A.V.; NOVO, R.R.; MACHADO, I.C. Floral polymorphism in *Chamaecrista flexuosa* (Fabaceae-Caesalpinioideae): a possible case of atypical enantiostyly?. **Annals of Botany**, v. 112, p. 1117-1123. 2013b.

ALMEIDA, N.M.; COTARELLI, V.M.; SOUZA, D.P.; NOVO, R.R.; SIQUEIRA FILHO, J.A.; OLIVEIRA, P.E.; CASTRO, C.C. Enantiostylous types of Cassiinae species (Fabaceae-Caesalpinioideae). **Plant Biology (Stuttgart)**. v. 17, p. 740-745. 2015a.

ALMEIDA, N. M.; BEZERRA, T.T.; OLIVEIRA, C. R.S.; NOVO, R.R.; SIQUEIRA-FILHO, J.A.; OLIVEIRA, P.E.; CASTRO, C.C. Breeding systems of enantiostylous Cassiinae species (Fabaceae, Caesalpinioideae). **Flora (Jena)**, v. 215, p. 9-15, 2015b.

ALSON, RE; TURNER B.L. Natural hybridization among four species of *Baptisia* (Leguminosae). **American Journal of Botany** v.50, p. 159-173. 1963.

BRADSHAW, H. D.; WILBERT J.R.S.M.; OTTO, K.G.; SCHEM-SKE, D.W. Genetic mapping of floral traits associated with reproductive isolation in monkey flowers (*Mimulus*). **Nature**, v.376, p.762–765. 1995.

BRASIL. Portaria N° 57, de 26 de setembro de 2000. Reconhece como RPPN a propriedade da Paroquia de São Miguel, denominada: Nossa Senhora do Oiteiro de Maracaípe no Município de Ipojuca, Estado do Pernambuco. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, n. 187-E, 26 set. 2000. Seção I, p. 98. LSSN 1415-1537.

Chamaecrista in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em:<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB82925>>. Acesso em: 01 abr. 2019.

- CONCEIÇÃO A.S.; QUEIROZ L.P.; LEWIS G.P.; ANDRADE M.J.G.; ALMEIDA P.R.M.; SCHNADELBACH A.S.; BERG C.V.D. Phylogeny of *Chamaecrista* Moench (Leguminosae–Caesalpinioideae) based on nuclear and chloroplast DNA regions. **Taxon**, 58,1168–1180. 2009.
- CONCEIÇÃO. A.S. **Filogenia do gênero Chamaecrista (Leguminosae Caesalpinioideae) e taxonomia do grupo Baseophyllum**. Tese de Doutorado, Universidade de Feira de Santana, Brasil. 2006.
- CORREIA, C.L.S.B.; CONCEIÇÃO, A. S. The genus *Chamaecrista* Moench in a fragment of the Ecological Station Raso da Catarina, Bahia, Brazil. **Biota Neotropica**, v.17, n.2. p. 01-16. 2017.
- COSTA C.B.N.; LAMBERT S.M.; BORBA, E.L.; QUEIROZ, L.P. Post-zygotic reproductive isolation between sympatric taxa in the *Chamaecrista desvauxii* complex (Leguminosae-Caesalpinioideae). **Annals of Botany** v.99, p.625-635. 2007.
- COSTA, C.B.N.; COSTA, J.A.S.; de QUEIROZ, L.P.; BORBA, E.L. Self-compatible sympatric *Chamaecrista* (Leguminosae - Caesalpinioideae) species present different interspecific isolation mechanisms depending on their phylogenetic proximity. **Plant Systematics e Evolution**, v. 299, p. 699-711. 2013.
- ELLSTRE, N.C.; ELAM, D.R. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. **Annuals Rev. Ecol. Syst.**, v.24, p.217–242. 1993.
- ENDRESS, P.K. **Diversity e evolutionary biology of tropical flowers**. Cambridge University Press, Cambridge. 1994.
- FENSTER CB. Mirror image and their effect on outcrossing rate in *Chamaecrista fasciculata* (Leguminosae). **American Journal of Botany** v.82, p. 46-50. 1995.
- FOURNIER, L.A. 1974. Un método cuantitativo para la medición de características fenológicas en árboles. **Turrialba** v.24, p. 422-423.
- FRANCESCHINELLI, E.V. The pollination biology of two species of *Helicteres* (Malvaceae) with different mechanisms of pollen deposition. **Flora (Jena)**, v. 200, p. 65-73. 2005.

- GOTTSBERGER G, SILBERBAUER-GOTTSBERGER I. Evolution of flower structures and pollination in neotropical Cassiinae (Caesalpinioideae) species. **Phyton** v. 28, p. 293- 320. 1988.
- PINHEIRO, F.; COZZOLINO, S.; DE BARROS, F.; GOUVEIA, T.M.Z.M. ; SUZUKI, R.M.; FAY, M.F. ; PALMA-SILVA, C. Phylogeographic structure and outbreeding depression reveal early stages of reproductive isolation in the neotropical orchid *epidendrum denticulatum*. **Evolution (Lancaster, PA.)**, v. 67, p. 2024-2039, 2013.
- GREINER, S.; RAUWOLF, U.; MEURER, J.; HERRMANN, R.G. The role of plastids in plant speciation. **Molecular Ecology**, v. 20 n. 4, p. 671–691, 2011.
- HAWKINS, J.A; OLASCOAGA LW; HUGHES C.E.; JIMENEZ JRC; RUARO PM. Investigation and documentation of hybridization between *Parkinsonia aculeata* and *Cercidium praecox* (Leguminosae: Caesalpinioideae). **Plant Systematics and Evolution** v.216, p. 49-68. 1999.
- INMET. **Instituto Nacional de Meteorologia**. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/portal/>>. Acesso em: 18 mai. 2017.
- IRWIN, H.S. AND BARNEBY, R.C. The American Cassinae: a synoptical revision of Leguminosae tribe Cassieae subtribe Cassinae in the New World. **Memoirs of the New York Botanical Garden**, v. 35: p. 455–918. 1982.
- JESSON, L.K.; BARRETT, S.C.H. The comparative biology of mirror-image flowers. **International Journal of Sciences**, v.164, n. 05, p.237-249. 2003.
- JOHNSON, N.A. Hybrid incompatibility genes: remnants of a genomic battlefield?. **Trends in genetics**, v. 26, p. 317-325. 2010.
- JUDD, W.S.; CAMPEBELL, C.S.; KELLONG, E.A.; STEVENS, P.F.; DONOGHUE, M. J. **Sistemática vegetal: um enfoque filogenético**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 632. 2009.
- KÖPPEN, W. 1948. Climatologia: com un estudio de los climas de la tierra. Mexico.
- LAU, C.P.Y, RAMSDEN L.; SAUNDERS, R.M.K. Hybrid origin of *Bauhinia blakeana* (Leguminosae: Caesalpinioideae), inferred using morphological, reproductive, and molecular data. **American Journal of Botany** v.92, p.525-533. 2005.

- LEVIN, D.A.; EERSON, W.W. Competition for pollinators between simultaneously flowering species. **American Naturalist**, v. 104, p. 345-354. 1970.
- LEWIS, G.P. Tribe Cassieae. In: Lewis, G.P.; Schrire, B.; Mackinder, B. e Lock, M. (eds.). Legumes of the world. **Royal Botanic Gardens, Kew**. p. 111-125. 2005.
- LEXER, C.; FAY, M.F.; JOSEPH, J.A.; NICA, M.S.; HEINZE, B. Barrier to gene flow between two ecologically divergent *Populus* species, *P. alba* (white poplar) e *P. tremula* (European aspen): the role of ecology e life history in gene introgression. **Molecular Ecology**, v.14, p. 1045–1057. 2005.
- LIU H; KOPTUR S. Breeding system and pollination of a narrowly endemic herb of the Lower Florida Keys: impacts of the urban-wildland interface. **American Journal of Botany** v.90, p. 1180-1187. 2003.
- MAIA, F. V.; MESSIAS, M. C. T. B. e MORAES, M.G. Efeitos de Tratamentos Pré-Germinativos na Germinação de *Chamaecrista dentata* (Vogel) H.S. Irwin & Barneby. **Floresta e Ambiente**; v.17, n.1,p.44-50. 2010.
- MARAZZI B; ENDRESS PK; QUEIROZ PL; CONTI E. Phylogenetic relationships within *Senna* (Leguminosae, Cassiinae) based on three chloroplast DNA regions: patterns in the evolution of floral symmetry and extrafloral nectaries. **American Journal of Botany** v.93, p. 288-303. 2006.
- MATALLANA G., GODINHO M.A.S., GUILHERME F.A.G., et al. Breeding systems of Bromeliaceae species: evolution of selfing in the context of sympatric occurrence. **Plant Systematics and Evolution** v. 289, p. 57-65. 2010.
- MATALLANA, G.; GODINHO, M.; GUILHERME, F.; BELISARIO, M.; COSER, T. & WENDT, T. “Breeding Systems of Bromeliaceae Species: Evolution of Selfing in the Context of Sympatric Occurrence”. **Plant Systematics and Evolution**, v.289, p.57-65, 2010.
- MURCIA, C. **Forest fragmentation e the pollination of neotropical plants**. In: SCHELLAS J.; GREENBERG, R. (eds.). *Forest patches in tropical landscapes*. Isle Press, London, p. 19-36. 1995.

NASCIMENTO, A.P.S.; LOPES, J. C. E MACIEL, K.S. Germinação de Sementes de rabo de pitú (*Chamaecrista desvauxii*) **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v.8, n.15; p. 970-976. 2012.

NOSIL P.; CRESPI, B.J. Ecological divergence promotes the evolution of cryptic reproductive isolation. **Proceedings of the Royal Society**, v.273, p. 991-997. 2006.

QUEIROZ, L. P. **Leguminosas da Caatinga**. 1. ed. Feira de Santana: Universidade Estadual de Feira de Santana, v. 1. 443p. 2009.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, Disponível em: URL <<http://www.R-project.org/>>. Acesso: 28 mai. 2017.

RANDO J. G.; PIRANI, J. R Padrões de distribuição geográfica das espécies de *Chamaecrista* sect. *Chamaecrista* ser. *Coriaceae* (Benth.) H. S. Irwin & Barneby, Leguminosae – Caesalpinioideae. **Revista Brasil. Bot.**, v.34, n.4, p.499-513. 2011.

SAKAI, S.; WRIGHT, S.J. Reproductive ecology of coexisting Psychotria species (Rubiaceae): when is heterostyly lost?. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 93, p. 125-134. 2008.

SCOPECE, G.S.; COZZOLINO, S.D.J.; SCHIESTL, F.P. Pollination efficiency e the evolution of specialized deceptive pollination systems. **American Naturalist**, v. 175, p. 98–105. 2010.

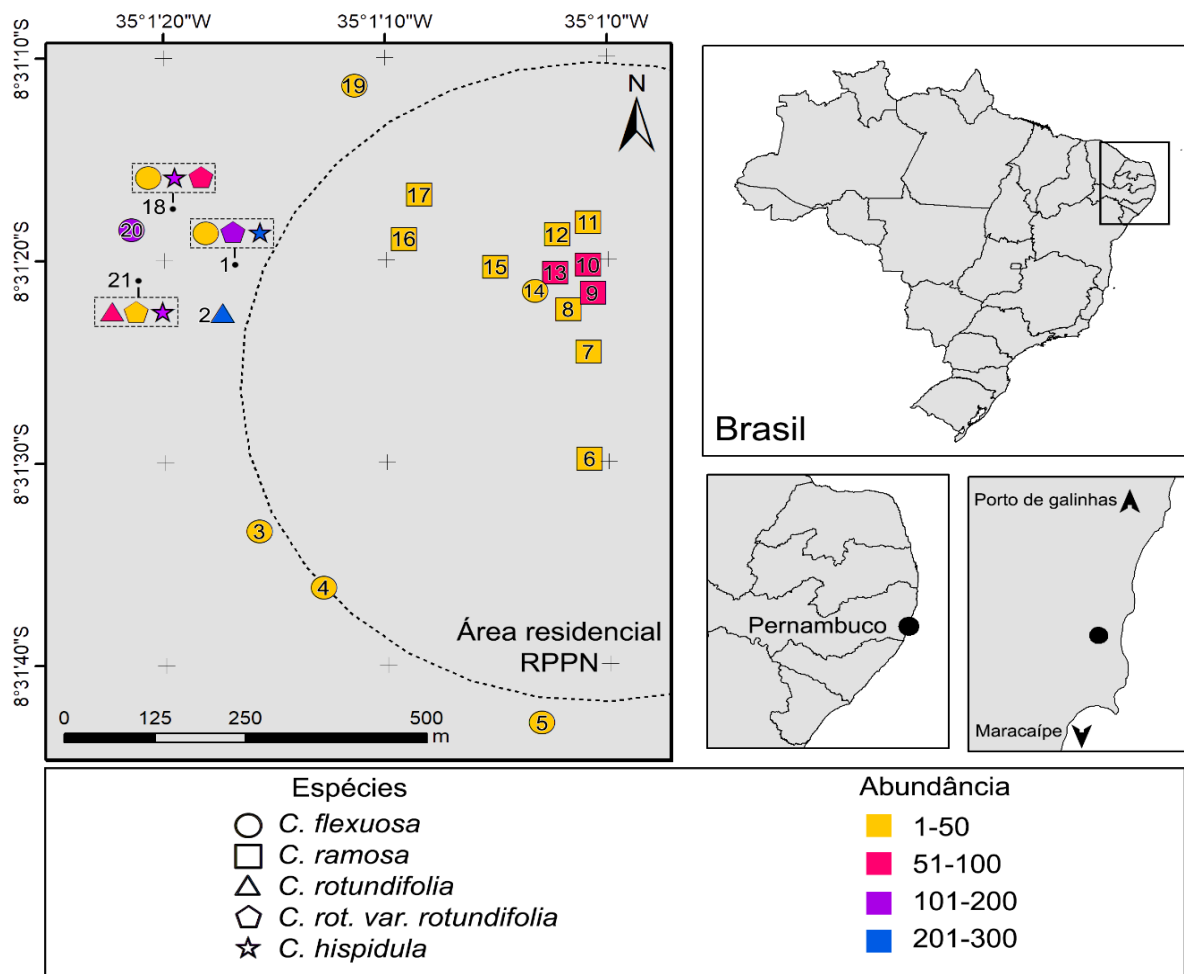


Figura 2. Distribuição espacial das populações de *Chamaecrista* (Fabaceae) georreferenciadas na RPPN de Nossa Senhora do Oiteiro de Maracáipe, Ipojuca, Pernambuco, Brasil. Os pontos representam ocorrência das espécies estudadas e as cores o número de indivíduos reprodutivos encontrados para cada população (SIRGAS:2000; Por: Alessandra K.G. Targino, 2018).

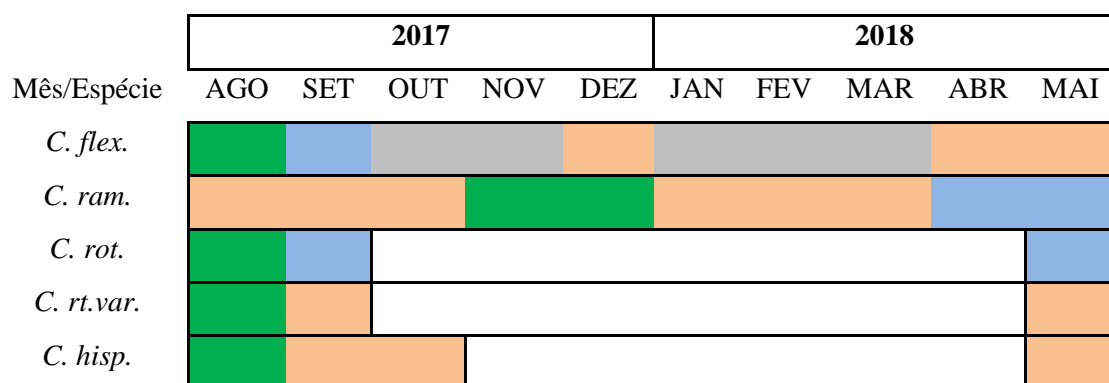


Figura 3. Representação do índice de atividade floração (%) nas espécies *C. flexuosa*; *C. ramosa*; *C. rotundifolia*; *C. rotundifolia* var. *rotundifolia* e *C. hispidula* na RPPN de Nossa Senhora do Oiteiro de Maracápe, Ipojuca- PE. As cores representam a proporção 100% (verde); 75% (azul); 50% (cinza) e 25% (marrom) e ausente 0% (branco).

Tabela 1. Cruzamentos bidirecionais, entre espécies sincronopátricas de *Chamaecrista* ocorrentes na RPPN Nossa Senhora do Oiteiro de Maracaípe, PE. R x D=Receptor x Doador; C: Cruzamento bidirecional; FF=Formação de Frutos; G%= Porcentagem de germinação das sementes híbridas por tamanho da amostra (N).

Cruzamentos (R x D)	Flores/Frutos	FF (%)	G%/N
<i>C. rotundifolia</i> x <i>C. hispidula</i>	25/12	48.0	68/25
<i>C. hispidula</i> x <i>C. rotundifolia</i>	22/4	18.2	85.7/14
<i>C. rotundifolia</i> x <i>C. ramosa</i>	22/17	77.2	84/25
<i>C. ramosa</i> x <i>C. rotundifolia</i>	29/8	27.5	0/2
<i>C. rotundifolia</i> x <i>C. flexuosa</i>	30/7	23.3	50/6
<i>C. flexuosa</i> x <i>C. rotundifolia</i>	20/7	35.0	72/23
<i>C. rotundifolia</i> x <i>C. rot. var. rotundifolia</i>	30/24	80.0	64/25
<i>C. rot. var. rotundifolia</i> x <i>C. rotundifolia</i>	25/12	48.0	32/25
<i>C. hispidula</i> x <i>C. ramosa</i>	22/12	54.5	8/25
<i>C. ramosa</i> x <i>C. hispidula</i>	23/17	73.9	24/25
<i>C. hispidula</i> x <i>C. flexuosa</i>	19/4	21.0	0/12
<i>C. flexuosa</i> x <i>C. hispidula</i>	20/1	5.0	0/4
<i>C. hispidula</i> x <i>C. rot. var. rotundifolia</i>	30/12	40.0	83.3/6
<i>C. rot. var. rotundifolia</i> x <i>C. hispidula</i>	19/7	36.8	100/25
<i>C. ramosa</i> x <i>C. flexuosa</i>	19/2	10.5	0/6
<i>C. flexuosa</i> x <i>C. ramosa</i>	20/1	5.0	0/1
<i>C. ramosa</i> x <i>C. rot. var. rotundifolia</i>	21/6	28.5	80/25
<i>C. rot. var. rotundifolia</i> x <i>C. ramosa</i>	20/11	55.0	36/25
<i>C. flexuosa</i> x <i>C. rot. var. rotundifolia</i>	23/0	0.0	0/0
<i>C. rot. var. rotundifolia</i> x <i>C. flexuosa</i>	23/10	43.5	28/25

Tabela 2. Diversidade de visitantes florais de cinco espécies de *Chamaecrista*, na RPPN Nossa Senhora do Oiteiro de Maracaípe-PE. P=Polinizador; V=Visitante.

Visitantes/Espécies	Tipo Flexuosa	Tipo Ramosa			Tipo Amiciella
	<i>C. flex</i>	<i>C. ram</i>	<i>C. rot</i>	<i>C. rot. var.</i>	<i>C. his</i>
<i>Xylocopa carbonaria</i>	P	P	-	-	-
<i>X. cearensis</i>	P	P	-	-	-
<i>Centris</i> sp.1	V	-	-	-	-
<i>X. grisescens</i>	P	-	-	-	-
<i>Augochlora</i> sp.	-	V	V	P	P
<i>Centris</i> sp. 2	-	P	-	-	-
<i>Eufriesea</i> sp.	P	P	-	P	P
<i>Florilegus (Eufleurilegus)</i>	P	V	P	V	-
<i>Triepeolus</i> sp.	-	P	-	-	-
<i>X. (Neoxylocopa)</i> sp.	-	P	-	-	-
<i>X. frontalis</i>	-	-	P	V	-

Tabela 3. Apresentação das barreiras reprodutivas entre pares de espécies de *Chamaecrista*.

Cruzamentos bidirecionais	Temporal	Espacial	Morfológica	Fisiológica		Ecológica
				Pré rep.	Pós rep.	
<i>C. hispidula</i> x <i>C. rotundifolia</i>	Não	Não	Sim	Não	Não	Sim
<i>C. ramosa</i> x <i>C. rotundifolia</i>	Não	Não	Não	Não	Sim	Sim
<i>C. flexuosa</i> x <i>C. rotundifolia</i>	Não	Não	Sim	Não	Não	Não
<i>C. rot. var. rot.</i> x <i>C. rotundifolia</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Sim
<i>C. ramosa</i> x <i>C. hispidula</i>	Não	Não	Sim	Não	Não	Não
<i>C. flexuosa</i> x <i>C. hispidula</i>	Não	Não	Sim	Não	Sim	Não
<i>C. rot. var. rot.</i> x <i>C. hispidula</i>	Não	Não	Sim	Não	Não	Sim
<i>C. flexuosa</i> x <i>C. ramosa</i>	Não	Não	Sim	Não	Sim	Não
<i>C. rot. var. rot.</i> x <i>C. ramosa</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não
<i>C. rot. var. rot.</i> x <i>C. flexuosa</i>	Não	Não	Sim	Não	Não	Não

CAPÍTULO 2

RECIPROCIDADE EM FLORES ENANTIOSTÍLICAS DE *Chamaecrista* Moench. (FABACEAE)

Manuscrito a ser enviado ao periódico *Flora*

RECIPROCIDADE EM FLORES ENANTIOSTÍLICAS DE *Chamaecrista* Moench. (FABACEAE)

Thatiany Teixeira Bezerra¹; Cibele Cardoso de Castro^{1,2} & Natan Messias de Almeida^{1,3*}

¹ Programa de Pós-graduação em Botânica, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Avenida Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE. 52171-900, Brasil.

² Universidade Federal Rural de Pernambuco, Avenida Bom Pastor, s/n, Boa Vista, Garanhuns, PE. 55292-270, Brasil.

³ Universidade Estadual de Alagoas, Campus III, Rodovia AL-115, km 03, Palmeira dos Índios, AL. 57.312-270, Brasil.

Título resumido: Reciprocidade em *Chamaecrista*

* Autor para correspondência: Tel .: +5581998025118. E-mail: natanmessias@yahoo.com.br (N.M. Almeida).

RESUMO:

Estudos atuais sugerem a possibilidade do sistema enantiostílico apresentar desvios, considerados como “atípicos” em relação ao padrão hercogâmico recíproco. O grupo Cassiinae tem despertado o interesse devido às características adequadas para estudos evolutivos e ecológicos referentes à biologia da polinização, ao sistema reprodutivo e a variações de respostas adaptativas das populações naturais a processos de mudanças ambientais. Este estudo teve o objetivo de analisar a reciprocidade intra e interespecífica em flores enantiostílicas de populações sincronopátricas de *C. ramosa* e *C. rotundifolia*. Através de um banco de imagens de flores das espécies utilizando uma trena como escala. Foram feitas medições a partir de imagens em 10 flores abertas do dia por 10 (*C. ramosa*; n=100) e cinco (*C. rotundifolia*; n=50) dias, em três agrupamentos por espécie. As imagens foram analisadas a partir de um tabuleiro gradeado (letras x números) em escala de milímetros e com auxílio do software *power point*. Foram medidos em cada flor os seguintes caracteres: altura e afastamento em relação ao centro floral do estigma e da pétala falcada, além do diâmetro floral. Verificamos que dias intercalados há produção de flores de maiores tamanhos. Para *Chamaecrista ramosa* a morfologia floral variou entre 20,7-24,3mm e *C. rotundifolia* variou de 7,7-12,6mm de comprimento. *C. ramosa* apresenta, maior tamanho floral e maior amplitude de captação e deposição de pólen comparado à *C. rotundifolia*, sendo assim, pode apresentar-se como promotor de aumento da área de deposição e captação de pólen no corpo do polinizador, aumentando a especificidade dos cruzamentos e reduzindo as chances de geitonogamia.

Palavras-chave: distília, Cassiinae, morfometria, melitofilia, sucesso reprodutivo.

ABSTRAT:

Current studies suggest the possibility of the enantiostolic system presenting deviations, considered as "atypical" in relation to the reciprocal hercogamic pattern. The Cassiinae group has aroused interest because of the characteristics suitable for evolutionary and ecological studies regarding the biology of pollination, the reproductive system and variations of the adaptive responses of natural populations to processes of environmental changes. The objective of this study was to analyze intra and interspecific reciprocity in enantiosthetic flowers of synopopathic populations of *C. ramosa* and *C. rotundifolia*. Through a bank of images of

flowers of the species using a scale as scale. Measurements were taken from 10 open day flowers for 10 (*C. ramosa*; n = 100) and five (*C. rotundifolia*; n = 50) days, in three groups per species. The images were analyzed from a grid tray (letters x numbers) in a millimeter scale and with the help of *power point software*. The following characters were measured in each flower: height and spacing in relation to the floral center of the stigma and the fallow petal, besides the floral diameter. We verified that interspersed days there is production of flowers of larger sizes. For *Chamaecrista ramosa* the floral morphology varied between 20.7-24.3mm and *C. rotundifolia* ranged from 7.7-12.6mm in length. *C. ramosa* shows a larger floral size and a greater amplitude of pollen uptake and deposition compared to *C. rotundifolia*, thus being able to present an increase in the pollen deposition and capture area in the pollinator body, increasing the specificity of crosses and reducing the chances of geitonogamy.

Key words: distilia, Cassiinae, morphometry, melitofilia, reproductive success.

1. INTRODUÇÃO

A enantiostilia caracteriza-se pela ocorrência de hercogamia recíproca entre morfos nas populações, os quais diferem entre si pelo posicionamento do gineceu em relação ao eixo floral, podendo estar à direita ou esquerda (Jesson e Barrett, 2002). A maior parte dos estudos aponta a tendência da enantiostilia favorecer a transferência de pólen entre flores de morfos diferentes, por polinização cruzada (Irwin e Barneby, 1976; Barret, et al., 2000) ou por geitonogamia (Laporta, 2005).

Além da diversificação no posicionamento do gineceu, as espécies enantiostílicas podem variar em relação ao posicionamento do androceu. Em espécies enantiostílicas recíprocas o androceu é oposto ao gineceu, assim o estilete é voltado para a direita em relação ao centro da flor e os estames são virados para a esquerda (flores direitas) e/ou o inverso (flores esquerdas), resultando em flores que formam imagens especulares (Jesson e Barrett, 2002). As espécies enantiostílicas não recíprocas produzem flores cujo posicionamento no androceu não varia (Jesson e Barrett, 2002).

A subtribo Cassiinae apresenta várias espécies enantiostílicas monomórficas não recíprocas nos gêneros *Cassia* L. (Westerkamp, 2004), *Chamaecrista* Moench. (Almeida et al., 2015) e *Senna* Mill. (Laporta, 2005). Nesse grupo, estudos atuais sugerem a possibilidade desse sistema

apresentar desvios, considerados como “atípicos” em relação ao padrão hercogâmico recíproco (Almeida et al., 2013). As variações registradas têm sido relacionadas a mecanismos de deposição de pólen das anteras e sua captura pelo estigma do corpo polinizador (Carvalho e Oliveira, 2003; Almeida et al., 2013). Estudos acerca do polimorfismo em tal grupo têm despertado o interesse devido as características adequadas para estudos evolutivos e ecológicos referentes à biologia da polinização, ao sistema reprodutivo e a variações de respostas adaptativas das populações a processos de mudanças ambientais (Jesson e Barrett, 2002).

Este fato trouxe novas discussões acerca de investigações sobre a funcionalidade ecológica deste mecanismo. Além disso, os autores notaram particularidades como no percurso dos grãos de pólen, que às vezes é conduzido pelas pétalas para chegar ao corpo do polinizador, em alternativa a ausência de reciprocidade das anteras em relação ao estigma (Almeida et al., 2013; 2015). Possíveis explicações para modelos atípicos estão relacionadas a impactos ambientais, tais como ausência ou ineficiência dos serviços de polinização ou perda de um dos morfos na população (Barrett, 2002).

A reciprocidade pode ser estabelecida por métodos investigativos que medem o contato dos estigmas com as anteras correspondentes, determinando ponto médio dos órgãos e infere o grau de desvio dos órgãos sexuais correspondentes, geram valores que avaliam o *fitness* das plantas dimórficas (Sá, 2016; Armbruster et al., 2017; Sanchez et al., 2008). Esta correspondência representa a posição perfeita no corpo do polinizador onde o pólen será depositado pelas anteras e capturada pelo estigma (Darwin, 1877; Ganders, 1979; Barrett, 2002; Barrett e Shore, 2008). Para a heterostilia, a hercogamia recíproca é verificada pela variação dos elementos sexuais de ambos os morfos e baseada através do índice de reciprocidade (IR), determinado pela razão: $(\text{altura da antera} - \text{altura do estigma recíproco}) / (\text{altura da antera} + \text{altura do estigma recíproco})$ (Sá, 2016). Segundo Richards e Koptur (1993), a reciprocidade é avaliada de forma conjunta, sendo que os valores deste índice variam de zero (reciprocidade mínima) a um (reciprocidade perfeita). Logo, quanto maior a dispersão desses valores maior será o afastamento do valor um (Sánchez et al., 2013).

Destacamos que para a enantioestilia não são conhecidas formas padrão de aferir a reciprocidade entre os morfos florais. Dessa forma, propomos um novo método para analisar a reciprocidade intra e interespecífica em flores enantioestílicas de populações simpátricas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local de estudo

O local de estudo foi a Reserva Particular do Patrimônio Natural de Nossa Senhora do Oiteiro de Maracaípe, localizada no município de Ipojuca, PE, Brasil (08° 831 '48' 'S; 35° 801' 05"W). A RPPN possui vegetação constituída 80% de restinga e 20% de mangue, com área total de 76,2 hectares (Brasil, 2000). O clima é tropical, quente e úmido (Koppen, 1948), as temperaturas médias anuais são 27°C e precipitação de 2000 mm/ano, com maior intensidade entre junho e agosto (Inmet, 2017).

2.2. Espécies do estudo

Foram estudadas duas espécies de *Chamaecrista* Moench. (Fabaceae): i) *C. ramosa* (Vogel) H.S.Irwin e Barneby; ii) *C. rotundifolia* (Pers.) Greene. Na área de estudo estas espécies ocorrem em sincronopatria com outras três espécies irmãs do gênero *Chamaecrista*: *C. rotundifolia* var. *rotundifolia*; *C. hispidula* e *C. flexuosa*. Estas espécies possuem flores com antese diurna, classificadas como enantiostílicas monomórficas, com hábito subarborescente e herbáceo, terrícolas, ocorrendo em áreas abertas da reserva.

As duas espécies são classificadas como enantiostílicas do Tipo Ramosa (Almeida et al., 2015a), apresentando deposição recíproca, indireta através de um conjunto de pétalas, tendo o final da pétala falcada como principal estrutura de deposição.

2.3. Caracterização dos morfios florais

Através de expedições de campo em 2017, foi possível montar um banco de imagens com flores sempre na mesma posição e utilizando uma trena como escala. Foram feitas medições a partir de imagens em 10 flores abertas do dia por cinco (*C. rotundifolia*; n=50) e 10 (*C. ramosa*; n=100) dias, em três agrupamentos por espécie. As imagens foram realizadas nas seguintes datas: 06 de junho; 8 e 30 de julho; 18 e 19 de agosto para a espécie *C. rotundifolia*. Para *C. ramosa* foram os dias 02 e 06 junho; 13,14 e 21 de julho; 02,03 e 11 de agosto; 02 setembro e 31 de dezembro. As imagens foram analisadas pelo modelo adaptado de tabuleiro gradeado (letras x números) em escala de milímetros e com auxílio do *software power point* 2010. Foram medidos em cada flor os seguintes caracteres: altura e afastamento em relação ao centro floral do estigma e da pétala falcada, além do diâmetro floral.

3. ANÁLISE DE DADOS

Verificamos se ocorreu diferença significativa no tamanho das flores de *C. ramosa* e *C. rotundifolia* de modo intraespecífico e interespecífico sendo analisado para cada 10 flores por 3 dias para cada espécie. Foi aplicado o teste de χ^2 (qui-quadrado) e as análises feitas utilizando o software R versão 3.4.3 (R Development Core Team, 2017). As demais análises foram realizadas por representações gráficas.

4. RESULTADOS

4.1. Posicionamento de pétalas

Em relação ao posicionamento das pétalas da espécie *C. rotundifolia* no morfotipo esquerdo a variação foi de 3-9mm de afastamento horizontal e 2-7mm de altura. Para o morfo direito a amplitude foi de 1-9mm de afastamento horizontal e 2-8mm de altura, sendo observado na figura 2 (A e B). No morfo esquerdo, os posicionamentos das pétalas ocorreram nos pontos de deposição 4-3mm (2x), 5-3mm (3x), 6-3mm (2x), 6-4mm (2x), 7-5mm (3x), 7-7mm (2x), 8-4mm (2x) e 9-6mm (2x) Já para as pétalas direitas os posicionamentos foram 1-2mm (2x), 1-3mm (2x), 1-4mm (8x), 1-5mm (7x).

As pétalas da espécie *C. ramosa* do morfotipo esquerdo apresentam variação de 1-8mm e 2-7mm, respectivamente para afastamento horizontal e de altura. Nas pétalas de flores direitas a amplitude foi de 1-4mm de afastamento horizontal e 2-6mm altura, ambos os morfos estão representados na figura 2 (C e D). No morfo esquerdo foi observado as seguintes repetições de posicionamento de deposição 1-3mm (2x), 5-3mm (4x), 5-4mm (5x), 5-5mm (4x), 5-6mm (2x), 6-4mm (6x), 6-5mm (5x), 6-6mm (4x), 7-5mm (4x) e 7-6mm (2x). No morfotipo oposto houve coincidências em 1-2mm (5x), 1-3mm (5x), 1-4mm (22x), 1-5mm (8x), 1-6mm (3x), 2-4mm (5x) e 4-3mm (2x).

4.2 Posicionamento de estigmas

Chamaecrista rotundifolia possui variação de posicionamento dos estigmas esquerdos entre 1-8mm de afastamento horizontal e 2-6mm de altura (fig. 3, A e B). No morfo direito, observamos variação de posicionamento dos estigmas entre 3-7mm de afastamento horizontal e 2-5mm de altura. Os posicionamentos do estigma de maior repetição no morfo esquerdo foram 1-2mm (2x), 1-3mm (5x), 4-3mm (1x), 5-4mm (2x), 5-5mm (4x), 6-4mm (1x) e 6-6mm (2x),

já no morfo direito os intervalos foram de 3-2mm (2x), 3-4mm (2x), 4-3mm (2x), 4-4mm (3x), 4-5mm (2x), 5-3mm (2x), 5-4mm (7x) e 5-5mm (2x).

Observamos nas flores de *C. ramosa*, que o posicionamento dos estigmas do morfo esquerdo variaram de 1-5mm de afastamento horizontal e 2-6mm de altura. No morfotipo direito o afastamento horizontal variou de 2-7mm e a altura de 2-8mm. As repetições de posicionamento, no morfo esquerdo, foram 1-2mm (5x), 1-5mm (2x), 2-4mm (8x), 2-5mm (4x), 3-4mm (4x), 3-5mm (8x) e 3-6mm (3x), 4-3mm (2x), 4-4mm (2x) e 4-5mm (2x). No morfo direito as repetições observadas foram nos pontos 2-3mm (2x), 3-5mm (4x), 4-3mm (5x), 4-5mm (7x), 5-4mm (9x), 5-5mm (7x), 5-6mm (2x), 5-7mm (2x), 6-4mm (3x), 6-5mm (3x) e 6-8mm (3x) apresentados na figura 3 (C e D).

4.3 Reciprocidade total de morfos

A reciprocidade em flores esquerdas de *C. rotundifolia*, ocorreu nos posicionamentos 3-3mm (2x), 4-3mm (1x), 4-4mm (1x), 5-4mm (2x), 6-4mm (1x) e 8-4mm (1x). Em flores direitas, exclusivamente no ponto 7-5mm (1x).

A reciprocidade não ocorreu (fig.4A) entre estigmas no morfo esquerdo, entre 1-6mm de afastamento horizontal e 2-5mm de altura, com repetições em 1-2mm (2x), 1-3mm (4x), 3-4mm (2x), 5-5mm (4x) e 6-6mm (2x), e para pétalas nos pontos 3-9mm e 2-7mm de afastamento horizontal e altura, respectivamente, com repetições em 5-3mm (3x), 6-3mm (4x), 7-5mm (3x) e 9-6mm (2x). O morfo direito não apresentou reciprocidade nos pontos 1-9mm de afastamento horizontal e 2-8 altura para estigmas e 3-6mm de altura e 2-5mm de altura para pétalas. Com repetições de 4-4mm (3x) e 5-4mm (4x) para estigmas e 1-4mm (8x) e 1-5mm (7x) para pétalas.

Em *C. ramosa* a variação da reciprocidade no morfo esquerdo ocorreu entre os pontos 1-5mm a 2-5mm de afastamento horizontal. No morfo direito variou entre 3-4mm de afastamento horizontal e 2-5mm de altura. Com repetições nos pontos 1-2mm (6x) e 2-4mm (9x), 4-3mm (2x), 4-5mm (2x), 5-5mm (3x) para o morfo esquerdo e de 2-5mm (3x) e 4-3mm (7x) para o direito.

Os pontos de ausência de reciprocidade em *C. ramosa* demonstram que no morfo esquerdo ocorrem amplitude de localização entre 1-4mm de afastamento horizontal e 4-6mm de altura. Com repetições nos pontos 2-5mm (4x), 3-4mm (4x), 3-5mm (8x), 3-6mm (3x) e pétalas 5-

8mm de afastamento horizontal e 3-7mm de altura, sendo as repetições nos pontos 5-3mm (4x), 5-4mm (5x), 6-4mm (6x), 6-5mm (5x) e 6-6mm (4x).

No morfo direito de *C. ramosa* possui variação de ocorrência para estigmas entre 2-7mm de afastamento horizontal e 2-8mm de altura, segundo a figura 4 (C e D), e para pétalas 1-4mm de afastamento horizontal e 2-6mm de altura. Com repetição dos estigmas nos pontos 4-5mm (7x), 5-4mm (8x), 5-5mm (7x), 5-4mm (8x), 6-4mm (3x), 6-5mm (3x) e 6-8mm (3x) e as seguintes repetições para pétalas 1-2mm (5x), 1-4mm (23x), 1-2mm (3x), 1-5mm (8x), 1-6mm (3x) e 2-4mm (4x).

4.4. Reciprocidade entre morfos por população

A reciprocidade nos morfos opostos ocorreu entre populações de *C. rotundifolia*, no entanto em poucas flores. A reciprocidade nas populações AxB ocorreu nos posicionamentos 1-4mm (esquerdo); 5-4mm (direito); 6-4mm (direito); 7-5mm (direito) e 8-4mm (esquerdo). Entre as populações BxC nos pontos 1-4mm (esquerdo); 5-4mm (direito); 6-4mm (direito); 7-5mm (direito). Nas populações AxC em ambos os morfotipos não ocorreu reciprocidade.

Entre as populações AxB de *C. ramosa*, a reciprocidade no morfo esquerdo ocorreu nos posicionamentos 2-4mm (direito e esquerdo); 5-5mm (direito e esquerdo); 4-5mm (esquerdo). No morfo direito a reciprocidade ocorreu apenas na posição 4-3mm (direito) tanto para as populações AxC, quanto para BxC.

4.5. Reciprocidade entre espécies: *C. ramosa* x *C. rotundifolia*

A reciprocidade dos estigmas esquerdos de *C. rotundifolia* com as pétalas esquerdas de *C. ramosa*, apresentado no gráfico A (fig. 5), resultou nos seguintes pontos 1-2mm (3x), 1-3mm (6x), 4-3mm (2x), 5-4mm (5x), 5-5mm (7x), 6-4mm (7x) e 6-6mm (5x). Os pontos de ausência de reciprocidade são destacados como 3-3mm (2x), 3-4mm(2x), 4-4mm (2x), 5-3mm (4x), 5-6mm (2x), 6-5mm (5x),7-5mm (4x) e 7-6mm (2x).

Os estigmas direitos de *C. rotundifolia* com as pétalas direitas de *C. ramosa* mostraram no gráfico B (fig. 5) coincidência nos pontos 4-3mm (4x) e 4-4mm (4x). Os pontos com ausência de reciprocidade foram 1-2mm (5x), 1-3mm (5x), 1-4mm (23x), 1-5mm (8x), 1-6mm (3x), 2-

4mm (5x), 2-5mm (2x), 3-2mm (2x), 3-4mm (2x), 4-5mm (3x), 5-3mm (2x), 5-4mm (7x) e 5-5mm (2x).

Os estigmas direitos de *C. ramosa* com as pétalas direitas de *C. rotundifolia*, mostram no gráfico C (fig. 5) ocorrendo pontos em 2-5mm (2x) e 7-5mm (2x). Observamos os pontos de ausência de reciprocidade em 1-2mm (2x), 1-3mm (2x), 1-4mm (8x), 1-5mm (7x), 2-3mm (2x), 3-5mm (4x), 4-3mm (5x), 4-5mm (7x), 5-4mm (9x), 5-5mm (7x), 5-6mm (2x), 5-7mm (2x), 6-4mm (3x), 6-5mm (3x) e 6-8mm (3x).

Os estigmas esquerdos de *C. ramosa* com as pétalas esquerdas de *C. rotundifolia* apresentam-se nos pontos 4-3mm (4x) e 4-4mm (3x), de acordo com o gráfico D (fig. 5). A ausência de reciprocidade foi notada em 1-2mm (5x), 1-5mm (2x), 2-4mm (8x), 2-5mm (4x), 3-4mm (4x), 3-5mm (8x), 3-6mm (3x), 4-5mm (2x), 5-3mm (3x), 6-3mm (2x), 6-4mm (2x), 7-5mm (3x), 7-7mm (2x), 8-4mm (2x) e 9-6mm (2x).

4.6. Tamanho floral

As flores de *C. rotundifolia* (fig. 1) variaram de 7,7mm a 12,6mm de comprimento. O tamanho médio das flores na população foi de 9,98mm. Para *C. ramosa* observamos que a morfologia floral (fig. 1) variou entre 20,7-24,3mm de comprimento, porém, as flores maiores são encontradas no quarto e nono dia e menores no sexto dia.

Avaliando a associação existente entre flores produzidas por dia de modo intraespecífico em *C. ramosa* ($X^2 = 11,242$ gl = 28; $p > 0,01$) e *C. rotundifolia* ($X^2 = 15,161$ gl = 28; $p > 0,01$), verificamos que o tamanho da morfologia floral é proporcional para cada espécie individualmente nos dias observados. Bem como, a relação interespecífica de proporcionalidade entre os tamanhos nestas espécies se mostrou significativa ($X^2 = 10,865$ gl = 28; $p > 0,01$).

5. DISCUSSÃO

Em flores de algumas espécies de Cassiinae, principalmente *Chamaecrista*, as pétalas diferenciadas apresentam a função de deposição do pólen de forma indireta no corpo do polinizador (Westerkamp, 2004; Almeida et al., 2013b; 2015a, b). Nestas espécies, ocorre o “ricochete” ou “looping”, nos quais os grãos, após a vibração das abelhas, são lançados contra

a pétala ricocheteando ou percorrendo a área da pétala falcada até a deposição no corpo das abelhas (Westerkamp, 2004; Almeida et al., 2013b; 2015a, b). Sendo assim, os posicionamentos das pétalas definem os locais do corpo das abelhas onde os grãos de pólen serão depositados. A maior amplitude observada para o posicionamento das pétalas de flores direitas em *C. rotundifolia* e esquerdas em *C. ramosa*, podem conferir maior área de deposição de pólen no corpo do polinizador, de forma inversa nas espécies. No entanto, as amplitudes nos dois morfos das espécies demonstram sobreposição na deposição de pólen. Mas, a avaliação das repetições nos posicionamentos de deposição demonstrou ausência de coincidência entre as espécies, podendo assim, reduzir a sobreposição de grãos de pólen no corpo das abelhas. É importante observar a ocorrência de sobreposição nos posicionamentos entre os morfos de ambas as espécies, levando a diferenças na classificação morfológica e funcional das flores (Almeida et al. 2013a), uma vez que pétalas posicionadas no lado direito, podem depositar pólen na porção esquerda do polinizador, o contrário ocorrendo em pétalas do lado esquerdo.

Da mesma forma que as pétalas, os estigmas apresentaram sobreposição no posicionamento dos morfos direito e esquerdo, assim como entre as espécies. Assim, flores funcionalmente direitas e esquerdas (Almeida et al., 2013a) foram observadas nos dois morfos. Contudo, apenas as amplitudes foram semelhantes, no geral, os principais pontos de posicionamento diferiram entre os morfos e espécies. A variação do posicionamento dos estigmas pode reduzir a competição por pólen no corpo do polinizador, uma vez que, diferindo nos principais posicionamentos do estigma, aumenta-se a área de captação dos grãos (Almeida et al., 2013a).

Em espécies hercogâmicas recíprocas (HR), a ocorrência de reciprocidade entre as estruturas sexuais de morfos recíprocos é essencial para possibilitar a polinização, e consequente formação de frutos e sementes (Barrett, 2002). Para espécies heterostílicas, outro caso de HR, a ocorrência da reciprocidade é analisada pela coincidência das alturas das estruturas sexuais de morfos recíprocos, onde posicionamentos iguais entre órgãos dariam a capacidade máxima ao fitness reprodutivo (Richards e Koptur, 1993; Eckert e Barrett, 1994; Sanchez et al., 2008; 2013). Sendo assim, nossos resultados apontam que as espécies estudadas, possivelmente, apresentam dificuldades na polinização e formação de frutos e sementes, devido ao baixo número de flores recíprocas.

Contudo, Armbruster et al. (2017) sugerem que os modelos matemáticos propostos para a avaliação da reciprocidade, carecem de uma relação clara entre os índices e entidades biológicas. O índice da inacurácia, mede o contato dos estigmas com as anteras

correspondentes, determinando o ótimo da flor, ou seja, ponto médio dos órgãos correspondentes (Armbruster et al., 2009; Armbruster et al., 2017), apresentando uma amplitude de possível captação e deposição de pólen no corpo dos polinizadores, sendo uma nova proposta para a análise do grau de reciprocidade em espécies com HR. No entanto, esse índice foi adaptado apenas para espécies heterostílicas, não sendo conhecida uma forma de utilização para a enantioestilia. Dessa forma, a utilização de modelos específicos para a enantioestilia, pode indicar que a ausência de reciprocidade observada em nosso estudo, não esteja prejudicando a reprodução das espécies de *Chamaecrista*, o que é evidenciado pelos estudos de Almeida e colaboradores (2013b; 2015b), os quais mostram que as espécies estudadas formam altas taxas de frutos naturalmente.

Assim como quando analisada a reciprocidade total, entre populações, o número de flores recíprocas também se mostrou baixo nas duas espécies. Como citado anteriormente, a ocorrência da reciprocidade é essencial para a reprodução das plantas. Adicionado a isso, a proporção semelhante de flores de morfos opostos na população é outro fator que contribui com a promoção do sucesso reprodutivo. Em estudos anteriores, Almeida e colaboradores (2013b) relataram a ocorrência de isopletia entre os morfos de *C. ramosa*, sendo esta proporção semelhante no próprio indivíduo, o que eleva a possibilidade de ocorrência da geitonogamia, principalmente pela autocompatibilidade ocorrente nas duas espécies (Almeida et al., 2013b; 2015b). Neste sentido, a variação observada no posicionamento de pétalas e estigmas, e consequente redução da reciprocidade pode apresentar-se como promotor de aumento da área de deposição e captação de pólen no corpo do polinizador, aumentando a especificidade dos cruzamentos e reduzindo as chances de geitonogamia.

A reciprocidade interespecífica entre morfos opostos, mostrou-se semelhante ao observado nas outras avaliações. Contudo, os estigmas de flores esquerdas de *C. rotundifolia*, apresentaram maior número de pétalas recíprocas em flores direitas de *C. ramosa*. Estes dados sugerem a possibilidade de ocorrência de deposição de pólen interespecífico em maior quantidade nas flores esquerdas de *C. rotundifolia*, principalmente pela partilha da abelha *Florilegus (Euforilegus)* sp. como polinizador (Capítulo 1). No entanto, a distribuição dos agrupamentos na área da reserva, o pico de floração não coincidente e diferenças no tamanho floral podem reduzir os eventos de fluxo de pólen interespecífico, que eventualmente levaria a geração de híbridos, vista como possível em outro estudo (Capítulo 1).

Apesar do baixo número de flores recíprocas observado, *C. ramosa* e *C. rotundifolia* apresentam sucesso reprodutivo na área de estudo, evidenciado pelos numerosos agrupamentos e frutos formados. Isso indica que a reciprocidade entendida como o valor exato do posicionamento das estruturas reprodutivas, não parece corresponder ao real, trazendo a necessidade da busca de diferentes formas de avaliação da reciprocidade em espécies enantiostílicas, principalmente em Cassiinae por suas especificidades. Contudo, o conhecimento destes valores de posicionamento, trazem a ideia da amplitude de deposição e captação dos grãos de pólen, seja pela forma indireta de deposição do pólen, levando a um maior espalhamento no corpo das abelhas, ou pela flexibilidade do estilete, aumentando a área de captação. Esta diversidade nos posicionamentos pode levar a um grau de especificidade elevado, o que reduziria as chances da ocorrência de geitonogamia e até mesmo do fluxo interespecífico de pólen, possível pela presença de outras espécies de *Chamaecrista* na reserva.

6. AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela bolsa concedida à primeira autora, ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal Rural de Pernambuco (PPGB) e ao Laboratório de Ecologia Reprodutiva (LERA/UFRPE) pelo apoio logístico.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida, N.M.; Castro, C.C.; Leite, A.V.; Novo, R. R.; Machado, I.C. 2013a. Floral polymorphism in *Chamaecrista flexuosa* (Fabaceae-Caesalpinioideae): a possible case of atypical enantiostyly?. **Annals of Botany**, 112, 1117-1123.

Almeida, N.M.; Castro, C.C.; De Lima Leite, A.V.; Novo, R. R.; Machado, I.C. 2013b. Enantiostyly in *Chamaecrista ramosa* (Fabaceae-Caesalpinioideae): floral morphology, pollen transfer dynamics and breeding system. **Plant Biology (Stuttgart)**, 15, 369-375.

Almeida, N.M.; Cotarelli, V.M.; Souza, D.P.; Novo, R.R.; Siqueira Filho, J.A.; Oliveira, P.E.; Castro, C.C. 2015a. Enantiostylous types of Cassiinae species (Fabaceae Caesalpinioideae). **Plant Biology (Stuttgart)**. 17, 740-745.

- Almeida, N. M.; Bezerra, T.T.; Oliveira, C. R.S.; Novo, R.R.; Siqueira-Filho, J.A.; Oliveira, P.E.; Castro, C.C. 2015b. Breeding systems of enantiostylous Cassiinae species (Fabaceae, Caesalpinioideae). **Flora (Jena)**, 215, 9-15.
- 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 Phytologist**. 215, 906-217.
- Barrett S.C.H.; Shore J.S. 2008. **New insights on heterostyly: comparative biology, ecology and genetics**. In: **Franklin-Tong VE**, ed. Self-incompatibility in flowering plants: evolution, diversity, and mechanisms. Berlin: Springer-Verlag, 3–32.
- Barrett, S.C.H., Jesson, L.K., Baker, A.M. 2000. The Evolution and function of stylar polymorphisms in flowering plants. **Annals of Botany**, 85, 253-265.
- Barrett,S.C.H. The evolution of plant sexual diversity. 2002. **Nature Reviews Genetics** 3, 274 284.
- Barrett, S. C. H. 2003. Mating strategies in flowering plants: the outcrossing-selfing paradigm and beyond. **Philosophical transactions of the Royal Society of London - Series B**, 358, 991-1004.
- Carvalho, D.A., Oliveira, P.E. 2003. Biologia reprodutiva e polinização de *Senna sylvestris* (Vell.) H. S. Irwin & Barneby (Leguminosae, Caesalpinioideae). **Revista Brasileira de Botânica** 26, 319–328.
- Darwin, C.R. 1877. **The different forms of flowers on plants of the same species**. London, UK: John Murray.
- Ganders, F.R. 1979. The biology of heterostyly. **New Zealand Journal of Botany**, 17, 607-635.
- Inmet. **Instituto Nacional de Meteorologia**. 2017. Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/portal/>. (Acessado em: 18 mai. 2017).
- Irwin, H.S.; Barneby, R.C. 1976. Notes on the generic of *Chamaecrista* Moench (Leguminosae: Caesalpinioideae). **Brittonia**, 28, 28-36.
- Jesson, L.K.; Barrett, S.C.H. 2002. The comparative biology of mirror-image flowers. **International Journal of Sciences**, v.164, 05, 237-249.

- Laporta, C. 2005. Floral biology e reproductive system of enantiostylous *Senna corymbosa* (Caesalpinaceae). **Revista de Biologia Tropical**, 53, 1-2, 49-61.
- Richards, J. H.; Koptur, S. 1993. Floral variation and distyly in *Guettarda scabra* (Rubiaceae). **American Journal of Botany** 80, 31-40.
- Sá, T.; Furtado, M.T.; Ferrero, V.; Pérez-Barrales, R.; Rodrigues, E.B.; Santos, I.G.; Consolaro, H.; 2016. Floral biology, reciprocal herkogamy and breeding system in four *Psychotria* species (Rubiaceae) in Brazil, **Botanical Journal of the Linnean Society**, 3, 182, 689–707.
- Sánchez J.M., Ferrero V., Navarro L. 2008. A new approach to the quantification of degree of reciprocity in distylous (*sensu lato*) plant populations. **Annals of Botany**, 102, 463–472.
- Sánchez L.M., Ferrero V., Navarro, L. 2013. Quantifying reciprocity in distylous and tristylous plant populations. **Plant Biology**, 15, 616-620.
- Westerkamp, C. **Ricochet pollination in Cassias – and how bees explain enantiostyly**. 2004. In: Magalhães FB, Pereira JO, eds. Solitary bees: conservation, rearing and management for pollination. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 225–230.



Figura 1. Flores das espécies: A) *C. ramosa* e B) *C. rotundifolia* na RPPN de Nossa Senhora do Oiteiro de Maracápe, Ipojuca (PE).

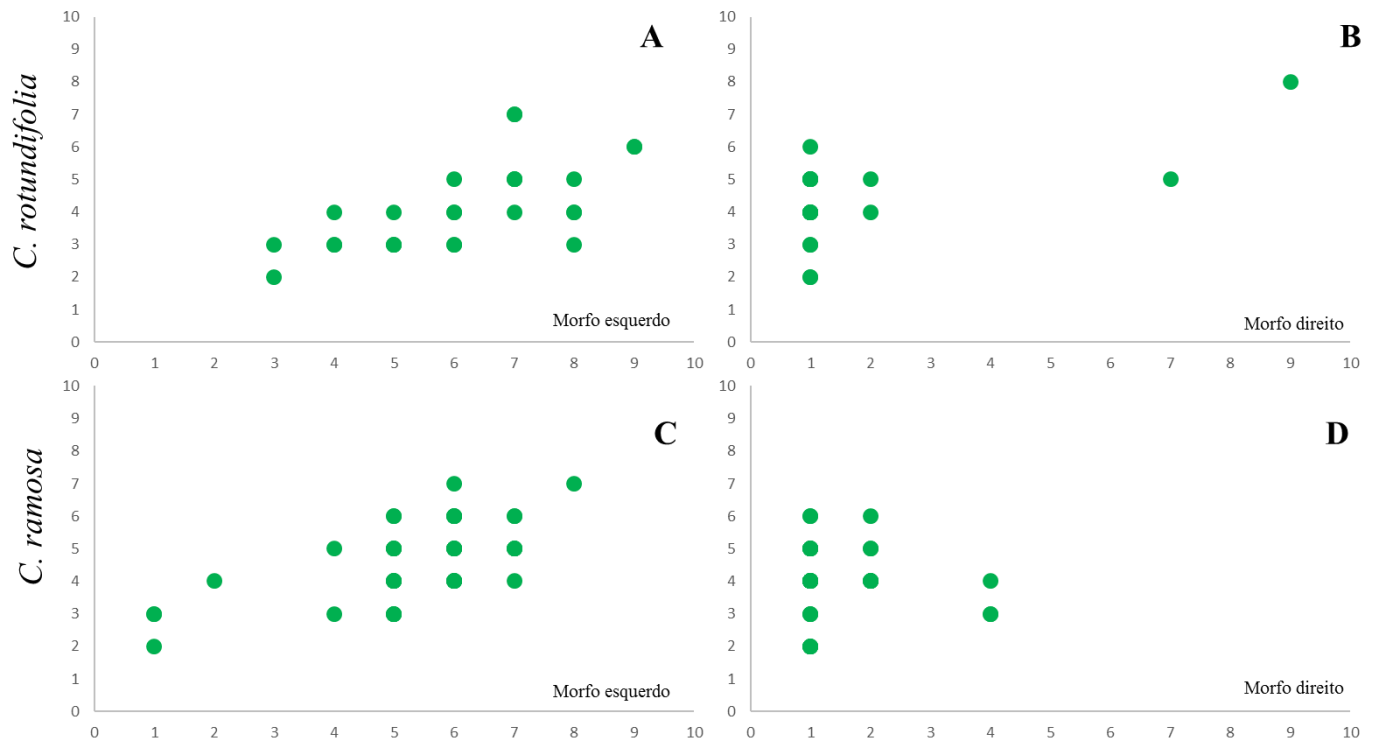


Figura 2. Posicionamento das pétalas (deposição do pólen) da espécie *C. rotundifolia*, (A) morfo esquerdo e (B) morfo direito e Posicionamento das pétalas (deposição do pólen) da espécie *C. ramosa*, (C) morfo esquerdo e (D) morfo direito.

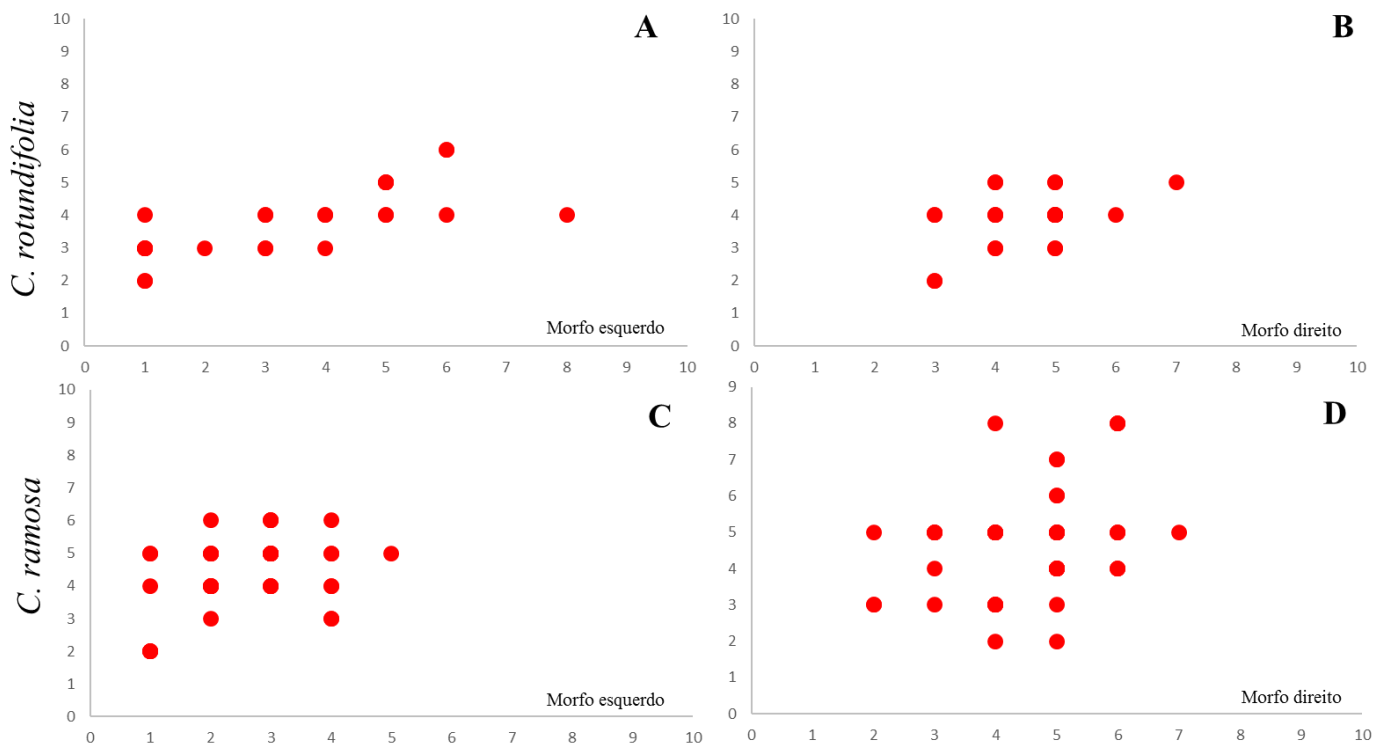


Figura 3. Posicionamento dos estigmas (captação do pólen) da espécie *C. rotundifolia*, (A) morfo esquerdo e (B) morfo direito e Posicionamento dos estigmas (captação do pólen) da espécie *C. ramosa*, (C) morfo esquerdo e (D) morfo direito.

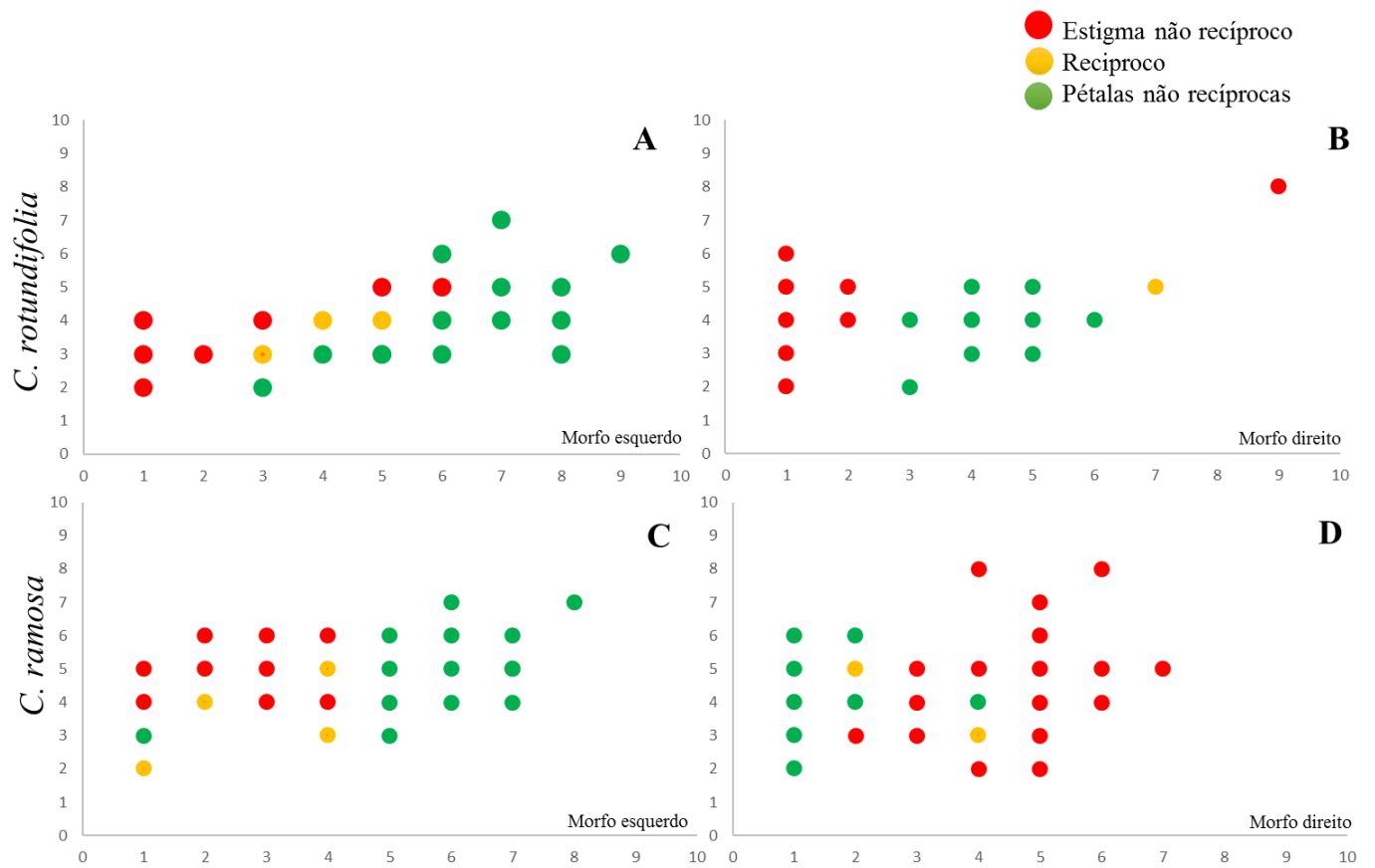


Figura 4. Reciprocidade total de morfos opostos de *C. rotundifolia* (estigma x pétala), (A) morfo esquerdo e (B) morfo direito, e Reciprocidade total de morfos opostos de *C. ramosa* (estigma x pétala recíproca), nos (C) morfo esquerdo e (D) morfo direito.

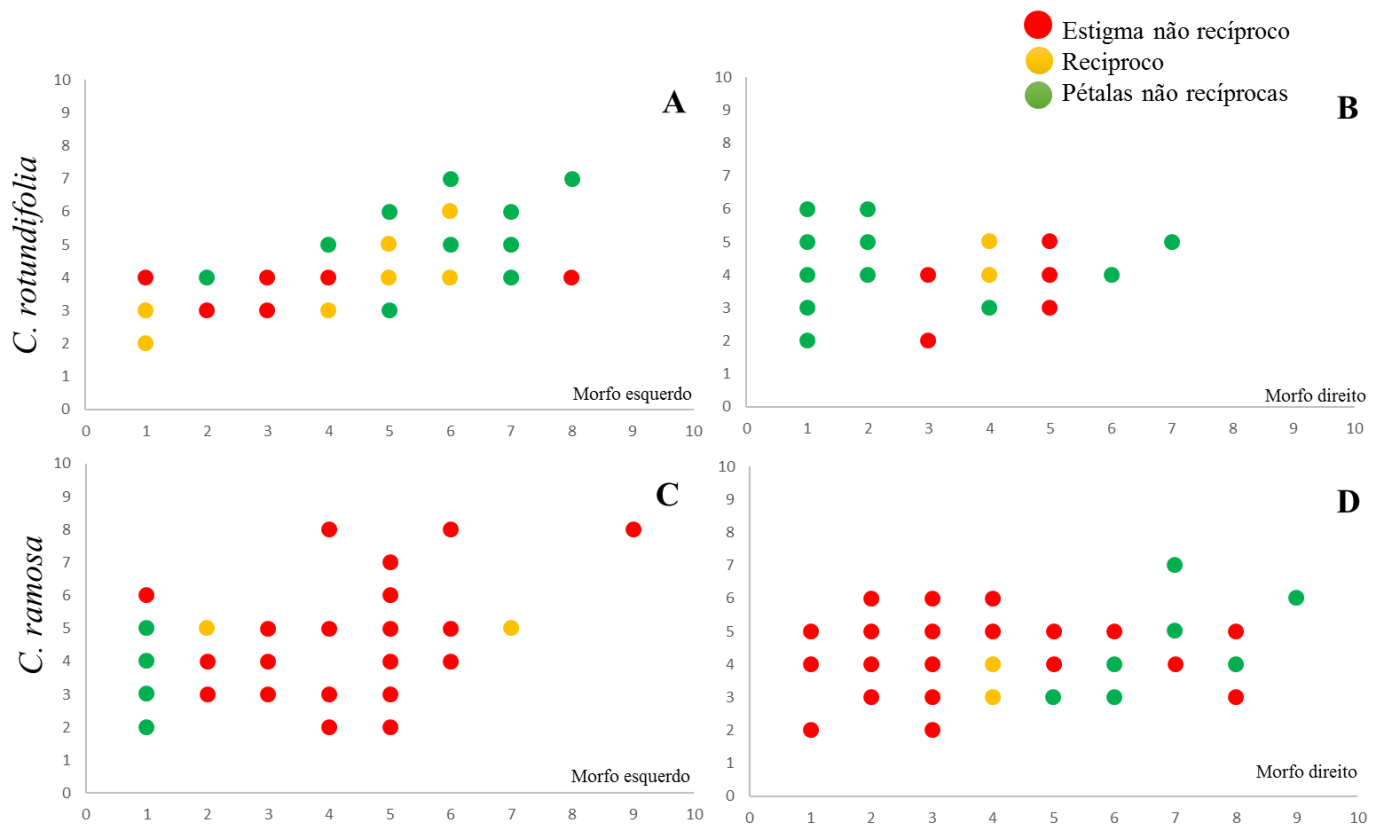


Figura 5. Relação de reciprocidade entre as espécies de *C. rotundifolia* e *C. ramosa*: (A) estigma esquerdo de *C. rotundifolia* X pétala esquerda de *C. ramosa*; (B) estigma direito de *C. rotundifolia* X pétala direita de *C. ramosa*; (C) estigma direito de *C. ramosa* X pétala direita de *C. rotundifolia* e (D) estigma esquerdo *C. ramosa* X pétala esquerda *C. rotundifolia*.

PREPARATION OF MANUSCRIPT

BASIC FORMATTING GUIDE: Authors should aim to communicate ideas and information clearly and concisely, in language suitable for the moderate specialist. Papers in languages other than English are not accepted unless invited. When a paper has joint authorship, one author must accept responsibility for all correspondence; the full postal address, telephone and fax numbers, and e-mail address of the author who is to check proofs should be provided. Although the Society does not specify the length of manuscripts, it is suggested that authors preparing long texts (20 000 words or more, including references, etc.) should consult the Editor before considering submission. **Please submit your manuscript in an editable format such as .doc, .docx or .rtf, prepared on A4, paginated, double spaced throughout (i.e. including references and quotations), with ample margins. If you submit your manuscript in a non-editable format such as PDF, this will slow the progress of your paper as we will have to contact you to request an editable copy.**

Title page

This should include title, authors, institutions and a short running title. The title should be concise but informative, and where appropriate should include mention of family or higher taxon in the form: 'Taxonomy of the oak, *Quercus* (Fagaceae)'. A subtitle may be included, but papers in numbered series are not accepted. Names of new taxa should not be given in titles.

Abstract: This must be on a separate page. The abstract is of great importance as it may be reproduced elsewhere, and is all that many may see of your work. It should be about 100-200 words long and should summarize the paper in a form that is intelligible in conjunction with the title. It should not include references. The abstract should be followed by up to ten keywords additional to those in the title (alphabetically arranged and separated by hyphens) identifying the subject matter for retrieval systems. Taxonomic authorities should not be included in the Abstract.

Subject matter: (i) The paper should be divided into sections under short headings. Except in systematic hierarchies, the hierarchy of headings should not exceed three. Do not combine Results and Discussion – these should be two different sections. Herbarium vouchers provide a permanent record of the plant material studied. Vouchers should be deposited in a recognized herbarium, and numbers/information should be included in the table or list of material used. In the case of population-level studies, one voucher per population will normally be considered adequate. Authors submitting papers to the Botanical Journal should consult www.ipni.org or *Authors of Plant Names* edited by R.K. Brummitt and C.E. Powell (Royal Botanic Gardens, Kew, 1992; ISBN 947-643-44-3). Names of genera and species should be printed in italic; suprageneric taxon names should be in roman. Cite the author of genera and lower taxa (subgenus, section, species etc.) on first mention in the main text. Manuscripts without author names will be returned. Authors of plant names should follow the abbreviations

of Brummitt & Powell, 1992, paying particular attention to the spacing (most do not have spaces following the full stops). These standard abbreviations can be found online at www.ipni.org

(ii) Use SI units and the appropriate symbols (mm, not millimetre; μm , not micron; s, not sec; Myr for million years). Use the negative index (m^{-1} , l^{-1} , h^{-1}) except in cases such as 'per plant'. Avoid elaborate tables of original or derived data, long lists of species etc.; if such data are absolutely essential, consider including them as appendices or as online-only supporting information. Avoid footnotes and keep cross references by page to an absolute minimum.

(iii) Families used follow APG IV (2016). See *Botanical Journal of the Linnean Society* 181: 1–20. Note particularly the use of Asteraceae (not Compositae) and Fabaceae (not Leguminosae). Names of suprageneric taxa (subtribe, tribe, subfamily, family, order etc.) are plural nouns and take plural verb forms e.g. “Allioideae are”, “Betulaceae comprise” etc.

(iv) Use of ‘chloroplast’ should be avoided when referring to plastid genome studies based on total genomic DNA extractions as other plastid types are involved. Use of ‘phylogeny’ should be avoided when reporting the results of an analysis (there is only one true phylogeny). Use ‘phylogenetic analysis’, ‘phylogenetic tree’ or similar. If abbreviations are used, ‘species’ should be abbreviated as ‘sp.’ (singular) or ‘spp.’ (plural) and ‘subspecies’ should be abbreviated as ‘subsp.’ (singular) or ‘subsp.’ (plural). Higher taxonomic ranks (genus, subgenus, section etc.) should not be abbreviated. *Sensu stricto* and *sensu lato* should be abbreviated as *s.s.* and *s.l.* (in italics), respectively.

References

We recommend the use of a tool such as EndNote or Reference Manager for reference management and formatting.

EndNote reference styles can be searched for here:
<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>

Reference Manager reference styles can be searched for here:
<http://www.refman.com/support/rmstyles.asp>

(i) In the text, give references in the following forms: 'Stork (1988) said', 'Stork (1988: 331)' where it is desired to refer to a specific page, and '(Rapport, 1983)' where giving reference simply as authority for a statement. Note that names of joint authors are connected by '&' in the text. When papers are by three authors, use all names on the first mention and thereafter abbreviate to the first name *et al.* For papers by four or more authors, use *et al.* throughout.

(ii) The list of references must include all publications cited in the text and only these. Prior to submission, make certain that all references in the text agree with those in the references section, and that spelling is consistent throughout. In the list of references, titles of periodicals must be given in full, not abbreviated. For books, give the title, place of publication, name of publisher (if after 1930), and indication of edition if not the first. In papers with half-tones, plate

or figure citations are required only if they fall outside the pagination of the reference cited. References should conform as exactly as possible to one of these four styles, according to the type of publication cited.

- **Burr FA, Evert RF. 1982.** A cytochemical study of the wound-healing proteins in *Bryopsis hypnoides*. *Cytobios* **6**: 199-215.
- **Gould SJ. 1989.** *Wonderful life: the Burgess Shale and the nature of history*. New York: W.W. Norton.
- **Dow MM, Cheverud JM, Rhoads J, Friedlaender J. 1987b.** Statistical comparison of biological and cultural/history variation. In: Friedlaender J, Howells WW, Rhoads J, eds. *Solomon Islands project: health, human biology, and cultural change*. New York: Oxford University Press, 265-281.
- **Gay HJ. 1990.** *The ant association and structural rhizome modifications of the far eastern fern genus Lecanopteris (Polypodiaceae)*. Unpublished D. Phil. Thesis, Oxford University.

(iii) Other citations such as papers 'in press' may appear on the list but not papers 'submitted', 'in review' or 'in preparation'. These may be cited in the text as 'unpubl. data'. A personal communication may be cited in the text but not in the reference list. Please give the initials and surnames for all authors of personal communications and unpublished data.

(iv) In the case of taxonomic reviews, authors are requested to include full references for taxonomic authorities.

(v) Give foreign language references in ordinary English alphabetic form (but copy accents in French, German, Spanish, etc.), if necessary transliterating in accordance with a recognized scheme. For the Cyrillic alphabet use British Standard BS 2979 (1958). If only a published translation has been consulted, cite the translation, not the original. Add translations not supplied by the author of the reference in square brackets.

Tables: Keep these as simple as possible, with few horizontal and, preferably, no vertical rules. When assembling complex tables and data matrices, bear the dimensions of the printed page (225 x 168 mm) in mind; reducing typesize to accommodate a multiplicity of columns will affect legibility.

Illustrations: These normally include (1) half-tones reproduced from photographs, (2) black and white figures reproduced from drawings and (3) diagrams. Use one consecutive set of Arabic numbers for all illustrations (do not separate 'Plates' and 'Text-figures' - treat all as 'Figures'). Figures should be numbered in the order in which they are cited in the text. Use upper case letters for subdivisions (e.g. Figure 1A-D) of figures; all other lettering should be lower case.

Half-tones reproduced from photographs: increasingly, authors' original images are captured digitally rather than by conventional film photography. In these cases, please use settings on your equipment for the highest possible image quality (minimum 300dpi). Desktop technology

now allows authors to prepare plates by scanning photographic originals and then labelling them using graphics programs such as Adobe Illustrator. These are acceptable provided:

- Resolution is a minimum of 300 dpi at the final required image size. The labelling and any line drawings in a composite figure should be added in vector format. If any labelling or line drawings are embedded in the file then the resolution must be a minimum of 800 dpi. Please note that vector format labelling will give the best results for the online version of your paper.
- Electronic files are saved uncompressed as TIFF or EPS files.
- In the case that it is not possible to provide electronic versions, please supply photographic prints with labelling applied to a transparent overlay or to a photocopy.

Grouping and mounting: when grouping photographs, aim to make the dimensions of the group (including guttering of 2 mm between each picture) as close as possible to the page dimensions of 168 × 225 mm, thereby optimizing use of the available space. Remember that grouping photographs of varied contrast can result in poor reproduction.

Colour: online-only colour in figures is free of charge. **Colour illustrations in print will be published free of charge at the editor's discretion.** Where possible, figure legends should apply equally well to both printed greyscale and online colour versions and should not specifically refer to the colour.

Black and white figures reproduced from drawings: these should be scanned at a minimum resolution of 800 dpi and supplied in TIFF format. Please note that JPEG, Powerpoint and doc files are not suitable for publication. Lines must be clean and heavy enough to stand reduction; drawings should be no more than twice page size. The maximum dimensions of published figures are 168 × 225 mm. Scale bars are the most satisfactory way of indicating magnification. Take account of proposed reduction when lettering drawings.

Diagrams: in most instances the author's electronic versions of diagrams are used and may be re-labelled to conform to journal style. These should be supplied as vector format Encapsulated PostScript (EPS) files. Please note that diagrams or graphs will not reproduce well in the online version of your paper unless they are in vector format due to low maximum screen resolution.

Type legends for Figures in numerical order on a separate sheet. Where a 'key' is required for abbreviations used in more than one Figure, this should be included as a section of the main text.

Authors wishing to use illustrations already published must obtain written permission from the copyright holder before submitting the manuscript. Authors may, in the first instance, submit good xerox or photographic copies of figures rather than the originals.

Upon revision papers should be submitted in an editable file format (i.e. not PDF) and figures should be submitted as separate, high-resolution, files.

For information on Latex files, please see: https://academic.oup.com/journals/pages/authors/latex_files

You can also send queries about figure files to botlin_oup@newgen.co.

Supplementary data: Submit all material to be considered as Supplementary Material online at the same time as the main manuscript. Ensure that the supplementary material is referred to in the main manuscript at an appropriate point in the text. Supplementary material will be available online only and will not be copyedited, so ensure that it is clearly and succinctly presented, and that the style conforms with the rest of the paper. Also ensure that the presentation will work on any Internet browser. It is not recommended for the files to be more than 2 MB each, although exceptions can be made at the editorial office's discretion.

PROOFS: Authors will receive a link to the PDF proof of their manuscript on our online system by email, and it is essential that a current email address is supplied with all manuscripts. Proofing instructions will accompany the PDF file but the proof should be checked immediately upon receipt and uploaded in accordance with covering instructions. Only essential corrections should be made at the proof stage.

ADVANCE ACCESS: For *Botanical Journal of the Linnean Society*, manuscripts arrive at OUP and go through the production process until the final versions are ready to publish. These are then published on an Advance Access page and they will remain on the page up until the issue to which they are assigned is published.

OFFPRINTS: All contributors of published articles will have free online access to the PDF and HTML version of their article, to which links can be created from an institutional or firm website. Authors of published articles can order and pay for paper offprints during the publication process – all authors are sent an individual link (after acceptance) to the 'Author Services' site, where they are able to order and pay for offprints and single issues.

FLORA

Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants. **ISSN:** 0367-2530

DESCRIPTION

FLORA, the scientific botanical journal with the longest uninterrupted publication sequence (since 1818), considers manuscripts in a range of areas of botany which appeal to a broad international scientific readership. The journal publishes original contributions and review articles on plant structure (morphology and anatomy), plant developmental biology (ontogeny), phytogeography (including phylogeography), plant population genetics, plant functional ecology (including ecophysiology), plant population ecology, biotic interactions between plants and other organisms, plant community ecology, and ecosystem ecology. Suggestions for Special Issues are welcome, as are compilations of manuscripts (both original

and review articles) for Special Features on a specific topic.

Manuscripts on the following subjects are highly welcome, especially when they integrate between areas or research approaches: comparative and evolutionary aspects of morphology, anatomy and development, ecophysiology of plant species related to their distribution, mechanisms of ecological interactions in plant communities (e.g. plant-plant interactions, plant-soil feedback, and plant- animal interactions), reproductive ecology including plant-pollinator interactions, genetic and spatial structure of plant populations, and functional diversity in plant communities.

Manuscripts focused on floristics or vegetation studies will only be considered if they go beyond a purely descriptive approach and have relevance for interpreting plant structure, distribution or ecology. Manuscripts whose content is restricted to taxonomy, phylogeny, nomenclature, or geobotanical or applied agricultural, horticultural, pharmacological or silvicultural aspects of local interest, or experimental studies dealing exclusively with investigations at the cellular or subcellular level will not be considered for publication.

AUDIENCE

Botanists, ecologists, ecophysicologists, specialists in vegetation science, vegetation ecology, plant geography, conservation biology, plant morphologists

IMPACT FACTOR

2017: 1.365 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2018

GUIDE FOR AUTHORS

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any

figures inprint *Graphical Abstracts / Highlights files*
(where applicable) *Supplemental files* (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'

- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our Support Center.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted.

2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. More information.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright- holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service Crossref Similarity Check.

Preprints

Please note that preprints can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's sharing policy. Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to

differences, and promotes equal opportunities. Articles should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader, should contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of race, sex, culture or any other characteristic, and should use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, for instance by using 'he or she', 'his/her' instead of 'he' or 'his', and by making use of job titles that are free of stereotyping (e.g. 'chairperson' instead of 'chairman' and 'flight attendant' instead of 'stewardess').

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. More information.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to

complete an 'Exclusive License Agreement' (more information). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of user license.

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. More information.

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the gold open access publication fee. Details of existing agreements are available online. Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs.
- No open access publication fee payable by authors.
- The Author is entitled to post the accepted manuscript in their institution's repository and make this public after an embargo period (known as green Open Access). The published journal article cannot be shared publicly, for example on ResearchGate or Academia.edu, to ensure the sustainability of peer-reviewed research in journal publications. The embargo period for this journal can be found below. ***Gold open access***
- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- A gold open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For gold open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The gold open access publication fee for this journal is **USD 1500**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our open access page for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. Find out more.

This journal has an embargo period of 12 months.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submit your article

Please submit your article via <https://www.evis.com/profile/api/navigate/FLORA>.

Submission of Papers with Graduate or Undergraduate Students as Lead Authors

FLORA has initiated a new section in its journal dedicated to highlighting exceptional, original research publications that are part of graduate or undergraduate student theses and carry the name of the student as the lead author.

Papers in this category will be published under the heading "**Highlighted Student Research**", and will be marked accordingly in the table of content of the volume in which it is published.

This initiative is intended to honor the highest quality student research, and papers must be recommended for this honor by Handling Editors for FLORA, following the normal peer review process.

Students who wish their papers to be considered for the honor should explain in the cover letter the main reasons why the paper represents an outstanding contribution to the field, and indicate such wish by marking the appropriate box for the FLORA Highlighted Student Research paper during the online submission process.

Referees

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our Support site. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

PREPARATION

Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. More information on types of peer review.

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Number pages and lines consecutively throughout the manuscript.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered

1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems.

Avoid abbreviations and formulae where possible.

- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower- case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract: Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view Example Graphical Abstracts on our information site.

Authors can make use of Elsevier's Illustration Services to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

Highlights: Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view example Highlights on our information site.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using British spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be

sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations: Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Nomenclature and taxonomic reference

If you have a small number of species (or vegetation units), please indicate full names and authorships upon first appearance in the text, and skip authors thereafter. In case of a large number of species names (or vegetation units), refer to a standard source for nomenclature such as a checklist or a flora. References (in FLORA format) may be added following the keywords, see example below. Do not use author citation for names in the text if they are given in the nomenclature source. **Nomenclature:** Stace (2010) for vascular plants; Hill et al. (2006) for mosses

Acknowledgements: Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources. List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements: Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence: This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of

1000 dpi. TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork: Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. Further information on the preparation of electronic artwork.

Illustration services: Elsevier's WebShop offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Figure captions: Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure, and add them at the very end of the manuscript file. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text: Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication and a copy of the title page of the relevant article must be submitted.

Web references: As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references: This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue: Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software: Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley. Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. More information on how to remove field codes from different reference management software.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/flora>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references can be listed either first alphabetically, then chronologically, or vice versa.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999).... Or, as demonstrated (Jones, 1999; Allan, 2000)... Kramer et al. (2010) have recently shown ...'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same

year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2018. The art of writing a scientific article. *Heliyon*. 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp.281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. *Mendeley Data*, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. . In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions here to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the research data page.

Data linking: If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the database linking page.

For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data: This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the Mendeley Data for journals page.

Data in Brief: You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes your data. Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. You are encouraged to submit your article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed and published in the open access data journal, *Data in Brief*. Please note an open access fee of 500 USD is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the Data in Brief website. Please use this template to write your Data in Brief.

MethodsX: You have the option of converting relevant protocols and methods into one or multiple MethodsX articles, a new kind of article that describes the details of customized research methods. Many researchers spend a significant amount of time on developing methods to fit their specific needs or setting, but often without getting credit for this part of their work. MethodsX, an open access journal, now publishes this information in order to make it searchable, peer reviewed, citable and reproducible. Authors are encouraged to submit their MethodsX article as an additional item directly alongside the revised version of their manuscript. If your research article is accepted, your methods article will automatically be transferred over to MethodsX where it will be editorially reviewed. Please note an open access fee is payable for publication in MethodsX. Full details can be found on the MethodsX website. Please use this template to prepare your MethodsX article.

Data statement: To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the Data Statement page.

The journal *FLORA* requires authors to deposit the data associated with accepted papers in a public archive. For gene sequence data and phylogenetic trees, deposition in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) or TreeBASE (<http://www.treebase.org>), respectively, is required. There are many possible archives that may suit a particular data set, including the Dryad repository for ecological and evolutionary biology data (<http://datadryad.org>). All accession numbers for GenBank, TreeBASE, and Dryad must be included in accepted manuscripts before they go to Production.

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of

errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's Webshop. Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the Elsevier Support Center to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also check the status of your submitted article or find out when your accepted article will be published.

© Copyright 2018 Elsevier |
<https://www.elsevier.com>