



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE**



Morfologia funcional de estiletos em Cassiinae (Leguminosae)

Recife
2022

JOSÉ RONALDO FERREIRA DE LIMA

Morfologia funcional de estiletos em Cassiinae (Leguminosae)

Dissertação apresentado ao Programa de Pós Graduação da Universidade Federal Rural de Pernambuco, para a obtenção do título de Mestre em Biodiversidade.

Orientador: Dr. Natan Messias de Almeida

Coorientadora: Dra. Cibele Cardoso de Castro

Coorientador: Dr. Vinícius Lourenço Garcia de Brito

Recife
2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- L732m Lima, José Ronaldo Ferreira de
Morfologia funcional de estiletes em Cassiinae (Leguminosae) / José Ronaldo Ferreira de Lima. - 2022.
62 f. : il.
- Orientador: Natan Messias de Almeida.
Coorientadora: Cibele Cardoso de Castro.
Inclui referências e anexo(s).
- Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, Recife, 2022.
1. Senna. 2. Chamaecrista. 3. Enantiostilia. 4. Aptidão reprodutiva. I. Almeida, Natan Messias de, orient. II. Castro, Cibele Cardoso de, coorient. III. Título

CDD 333.95

JOSÉ RONALDO FERREIRA DE LIMA

Morfologia funcional de estiletes em Cassiinae (Leguminosae)

Dissertação apresentada e _____ em ____/____/____

Examinadores:

Prof. Dr. Natan Messias de Almeida
PPGBio-UNEAL (Orientador)

Prof. Dr. Jefferson Thiago de Souza
UECE-FECLI (Titular)

Dr. Reinaldo Rodrigo Novo
CCST - INPE (Titular)

Dr. Gudryan Jackson Barônio
PPGE - USP (Suplente)

Dr. Raphael Matias da Silva
ITV/BRASIL (Suplente)

Recife
2022

Aos meus pais, familiares e amigos
por todo amor e incentivo, Dedico.

Amo vocês!

Agradecimentos

Aos meus pais e irmãs, por todo apoio aos meus sonhos pessoais e profissionais.

Aos meus amigos e familiares que estiveram sempre comigo dando todo suporte necessário nos momentos mais difíceis.

Ao meu orientador Dr. Natan Messias de Almeida por todas as orientações e experiências compartilhadas. Sou grato por todo acompanhamento, sempre estar disponível para ajudar, sua dedicação e por toda a sua paciência, como também pelas oportunidades acadêmicas que vêm enriquecendo meu crescimento profissional.

Aos meus coorientadores Dra. Cibele Cardoso de Castro e Dr. Vinícius Lourenço Garcia de Brito pelas contribuições que muito enriqueceram o meu trabalho e o meu crescimento profissional, e a Larissa Oliveira e Raphael Matias pelas contribuições nas análises e sugestões no trabalho.

Ao Grupo de Pesquisa Fragilidade Ecológica de Angiospermas da Universidade Estadual de Alagoas (UNEAL) pelos momentos compartilhados e experiência ganha durante toda a trajetória, desde a graduação até o suporte em todo o trabalho de campo, principalmente Charlane Moura e Leonardo. A contribuição de vocês foi essencial. Gratidão pelos “perrengues” compartilhados em campo e por todo o apoio.

Ao Programa de Pós-graduação em Biodiversidade da Universidade Federal Rural do Pernambuco e a todos os professores que fazem parte desta casa. Todos e todas trouxeram grandes contribuições para a minha formação.

A CAPES pela bolsa concedida, a qual foi essencial para elaboração do trabalho.

SUMÁRIO

Agradecimentos	8
RESUMO GERAL	11
1.REVISÃO DA LITERATURA.....	15
1.1 características morfológicas e funcionalidade da enantiostilia	15
1.2 polinização por vibração e deposição indireta de pólen	16
1.3 deposição e eficiência da captura de pólen	17
2.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19
CAPÍTULO 1:	24
RESUMO	26
INTRODUÇÃO.....	27
MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
Área de estudo.....	28
Espécies estudadas	29
Caracterização morfo-funcional dos morfos florais.....	29
Análise estatística.....	30
RESULTADOS	31
DISCUSSÃO	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
ANEXOS	39
CAPÍTULO 2:	45
RESUMO	47
INTRODUÇÃO.....	48
MATERIAL E MÉTODOS.....	50
Área de estudo.....	50
Espécie estudada	50
Frequência e comportamento dos visitantes florais	50
Sistema de acasalamento.....	50

	10
Eficiência da coleta de pólen.....	51
Ocorrência da autopolinização.....	52
Análise estatística.....	52
RESULTADOS	53
DISCUSSÃO.....	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
ANEXOS	61
CONSIDERAÇÕES FINAIS	64

Lista de figuras – Capítulo I

Figura 1: *Senna aversiflora* (A); *Senna uniflora* (B); *Chamaecrista fasciculata* (C).....39

Figura 2. Boxplots da proporção de tipos florais funcionais em indivíduos das três espécies estudadas. Os pontos cinza mostram os dados observados em cada indivíduo. Os valores estatísticos gerais são indicados no canto superior esquerdo de cada plot. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p < 0,05$) em testes post hoc.....39

Figura 3. Boxplots da proporção de tipos florais funcionais de acordo com o tipo morfológico em indivíduos das três espécies estudadas. Os pontos cinza mostram os dados observados em cada indivíduo. Os valores estatísticos gerais são indicados no canto superior esquerdo de cada plot. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p < 0,05$) em testes post hoc.....40

Figura 4. Boxplots do coeficiente de variação (CV) intra-individual na medida da distância horizontal dos estigmas nas flores esquerda e direita, com base no critério morfológico, das três espécies estudadas. Os pontos cinza mostram o CV observado nas flores esquerda ou direita de cada indivíduo. Pontos acima da linha vermelha indicam alta variação ($> 30\%$). As linhas conectam os dados observados dentro do mesmo indivíduo. Os valores estatísticos para comparações entre os tipos florais são indicados no canto superior esquerdo de cada plot.....41

Figura 5. Distribuição espacial e sobreposição na distância horizontal dos estigmas entre flores morfológicamente à esquerda (linhas pontilhadas) e à direita (linhas contínuas) das três espécies estudadas. A área cinza indica a proporção de sobreposição entre as flores esquerda e direita. O valor da proporção de sobreposição é apresentado na parte superior esquerda de cada plot. O intervalo entre as duas linhas verticais centrais indica a posição funcionalmente central do estigma.....42

Figura S2. Distribuição espacial e sobreposição intra-individual na distância horizontal dos estigmas entre flores morfológicamente à esquerda (linhas pontilhadas) e à direita (linhas contínuas) nos 10 indivíduos estudados de *Senna aversiflora*. A área cinza indica a proporção

de sobreposição entre as flores esquerda e direita. O valor da proporção de sobreposição de cada indivíduo é apresentado na parte superior esquerda de cada plot. O intervalo entre as duas linhas verticais centrais indica a posição funcionalmente central do estigma. Os plots foram ordenados de acordo com o nível de sobreposição de cada indivíduo.....42

Figura S3. Distribuição espacial e sobreposição intra-individual na distância horizontal dos estigmas entre flores morfológicamente à esquerda (linhas pontilhadas) e à direita (linhas contínuas) nos 10 indivíduos estudados de *Senna uniflora*. A área cinza indica a proporção de sobreposição entre as flores esquerda e direita. O valor da proporção de sobreposição de cada indivíduo é apresentado na parte superior esquerda de cada plot. O intervalo entre as duas linhas verticais centrais indica a posição funcionalmente central do estigma. Os plots foram ordenados de acordo com o nível de sobreposição de cada indivíduo.....43

Figura S4. Distribuição espacial e sobreposição intra-individual na distância horizontal dos estigmas entre flores morfológicamente à esquerda (linhas pontilhadas) e à direita (linhas contínuas) nos 10 indivíduos estudados de *Chamaecrista fasciculata*. A área cinza indica a proporção de sobreposição entre as flores esquerda e direita. O valor da proporção de sobreposição de cada indivíduo é apresentado na parte superior esquerda de cada plot. O intervalo entre as duas linhas verticais centrais indica a posição funcionalmente central do estigma. Os plots foram ordenados de acordo com o nível de sobreposição de cada indivíduo.....44

Lista de figura – Capítulo II

Figura 1: Imagem da vista frontal (A) e lateral (B) do pistilo de *S. aversiflora*, contendo os pontos homólogos.....61

Figura 2: Distribuição dos componentes de deformação parcial (RW1 e RW2) e representações de padrões de forma para cada pistilo de *S. aversiflora* do teste de autopolinização.....61

Figura 3: Distribuição dos componentes de deformação parcial (RW1 e RW2) e representações de padrões de forma para cada pistilo de *S. aversiflora* do teste de eficiência de coleta de pólen.....62

Lista de tabelas – Capítulo II

- Tabela 1.** Seleção fenotípica dos atributos T.E.L (tamanho do estilete vista lateral), RW1L (forma vista lateral) e amplitude do pistilo através do sucesso reprodutivo (w – densidade de pólen no estigma) de *Senna aversiflora* considerando os teste de autopolinização (ATP) e eficiência (EFI). Valores \pm erro padrão dos gradientes de seleção direcional (β_i), quadrática (γ_{ii}) e correlacional (γ_{ij}) são apresentados. A significância estatística é representada por asteriscos, onde $p < 0.05$ e os valores apresentados abaixo.....63
- Tabela 2.** Correlação entre as variáveis tamanho e forma (RW1 e RW2), em suas vistas laterais e frontais, e amplitude do pistilo no teste de eficiência, usando a correlação de Spearman.....63
- Tabela 3.** Correlação entre as variáveis tamanho e forma (RW1 e RW2) do pistilo, em suas vistas laterais e frontais, no teste de autopolinização, usando a correlação de Spearman.....64

RESUMO GERAL

Espécies do gênero *Senna* apresentam enantiostilia e flores com rica diversidade morfológica. As flores apresentam anteras poricidas e são polinizadas por abelhas capazes de vibrar os estames (polinização por vibração). O estudo foi realizado na Reserva Biológica de Pedra. Esta dissertação apresenta-se dividida em dois capítulos. O primeiro tem como objetivo investigar a proporção de morfos florais a partir da avaliação morfológica e funcional em três espécies de Cassiinae. Nossa hipótese é que a proporção de morfos é semelhante na avaliação morfológica, e distinta na avaliação funcional, com a presença do morfo central. Nossos dados mostram que, na avaliação morfológica, a proporção de flores esquerdas e direitas foi semelhante. No entanto, os morfos funcionalmente esquerdas (FE), direitas (FD) e centrais (FC) ocorreram em proporções diferentes em todas as espécies, com a variação e sobreposição do posicionamento do estigma dos morfos direito e esquerdo ocorrendo de forma distinta nas três espécies. Por outro lado, a alta variação e sobreposição dos posicionamentos dos estiletos, precisam ser melhor investigadas para termos o real entendimento das pressões seletivas que as conduziram e também sua funcionalidade, podendo ter como significado um maior aproveitamento do pólen no corpo do polinizador. O segundo capítulo tem como objetivo investigar a influência da variação morfológica dos estiletos e estigmas na captação de pólen nos corpos dos polinizadores, nos norteando pelas seguintes perguntas: P1) Como a forma do gineceu e a área da superfície estigmática influenciam na quantidade de pólen capturado e amplitude da captação?; P2) Como diferentes formas de gineceu e estigmas influenciam na ocorrência da autopolinização?. A partir dos resultados foi verificado valores semelhantes na deformação das formas dos estiletos, em ambos os testes de autopolinização e eficiência da coleta de pólen, na avaliação de seleção fenotípica a forma não apresentou ter influência direta na aptidão reprodutiva de *S. aversiflora*, entretanto no teste de eficiência da coleta de pólen, a amplitude de movimento indicou seleção direcional para amplitude menores dos estiletos, coletando maiores quantidade de pólen. Embora não se tenha verificado influência dos aspectos da forma do pistilo na aptidão, o trabalho traz informações importantes sobre aspectos reprodutivos de *S. aversiflora*.

Palavras chave: *Senna*; *Chamaecrista*; enantiostilia; aptidão reprodutiva.

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E FUNCIONALIDADE DA ENANTIOSTILIA

As angiospermas apresentam flores, que são estruturas fenotipicamente integradas que evoluíram para aumentar o sucesso na doação e recebimento de pólen entre indivíduos dentro de populações naturais, favorecendo o cruzamento e a manutenção da variabilidade genética (RECH, 2014). A manutenção dessa variabilidade é uma questão básica entre as espécies, para se manterem prósperas no ambiente em que estão inseridas, pois possibilitam o surgimento de novas características adaptativas que irão proporcionar caminhos evolutivos distintos diante das pressões seletivas impostas pelos ambientes (ARMBRUSTER et al., 2009).

O sucesso reprodutivo de algumas espécies está ligado diretamente com a eficiência na realização do cruzamento de pólen entre indivíduos, efetivando a polinização cruzada, que é um processo que consiste na transferência do grão-de-pólen das anteras de uma flor até o estigma da flor de outro indivíduo da mesma espécie, dependendo de vetores abióticos (fatores ambientais como vento e água) e bióticos (seres vivos como morcego, abelhas e pássaros) para gerar o fluxo de pólen entre as flores (RECH, 2014).

Algumas plantas, afim de garantir a polinização cruzada, fazem uso de artifícios fisiológicos e morfológicos, para garantir esse tipo de polinização, como é o caso de flores que apresentam polimorfismos florais que se caracterizam por apresentar duas ou mais diferentes formas florais dentro da mesma espécie (BARRETT et al., 2000; JESSON & BARRETT, 2003b). Dentre os polimorfismos destacam-se a heterostilia, o dimorfismo estilar e a enantiostilia (BARRETT et al. 2000). Entre esses, a enantiostilia se difere dos demais por apresentar dentro da mesma espécie, duas formas florais que diferem no posicionamento do estilete em relação ao centro floral. Em um morfo floral, o estilete está disposto à direita e as anteras à esquerda, configurando flores do morfo direito, e no outro morfo o estilete está à esquerda e as anteras à direita, sendo classificadas como morfo esquerdo (BARRETT 2002; JESSON & BARRETT, 2003b).

Na enantiostilia são descritas duas formas de apresentação, a dimórfica e a monomórfica (JESSON & BARRETT, 2003b). A forma dimórfica é caracterizada por ter indivíduos que apresentam apenas flores direitas ou esquerdas (BARRETT et al. 2000; JESSON et al. 2003a). Já na enantiostilia monomórfica, os indivíduos apresentam os dois morfos florais. Os indivíduos podem apresentar inflorescências com apenas um dos morfos ou inflorescências tanto com flores direitas quanto com esquerdas, distribuídas de forma aleatória ou seguindo algum padrão

(BARRETT, 2002; JESSON & BARRETT, 2003b). Outra característica está relacionada a proporção de flores de ambos os morfos na população, onde os estudos relacionados indicam isoplezia, ou seja, ambos os morfos apresentam distribuição semelhante na população, mantendo uma proporção de 1:1 colaborando com a redução da geitogamia (ALMEIDA et al. 2015; ALMEIDA et al. 2018; ALMEIDA & CASTRO 2019).

A morfologia das flores enantioestílicas é bem distinta e evolutivamente está relacionada com o fluxo de pólen entre os indivíduos. Devido ao posicionamento das estruturas reprodutivas, com as flores de um morfo formando imagens espaciais das flores do morfo oposto (BARRETT et al. 2000; JESSON et al. 2003a; ALMEIDA, 2013a), a transferência de pólen deve ocorrer apenas entre flores de morfos recíprocos. Esta dinâmica de transferência de pólen é viabilizada pelo padrão de deposição e captura de pólen que este polimorfismo floral apresenta. Polinizadores ao visitarem uma flor direita irão receber a carga de pólen do lado esquerdo e terão capturado o pólen do lado direito, nas flores esquerdas isto ocorre de forma inversa (BARRETT et al. 2000; BARRETT 2002b). Alguns estudos tratam da investigação da efetividade desse mecanismo de captura e deposição de pólen (BARRETT et al. 2000; JESSON & BARRETT 2002; JESSON & BARRETT, 2003b; 2013; ALMEIDA et al. 2015), no entanto, ainda existem inúmeras lacunas, acerca dessa temática, principalmente quando se trata da enantioestilia monomórfica (ALMEIDA et al. 2013a, b; 2015; 2018; AMORIM et al. 2017).

1.2 POLINIZAÇÃO POR VIBRAÇÃO E DEPOSIÇÃO INDIRETA DE PÓLEN

A polinização é um dos serviços ecossistêmicos mais importantes ocorrentes na natureza, com cerca de 90% das Angiospermas necessitando de agentes polinizadores para realizar o fluxo de pólen, sendo 60% desse serviço realizado eficientemente por abelhas (OLLERTON et al., 2011), justamente devido à grande diversidade e nível de adaptação com a morfologia floral e comportamento de forrageio.

Algumas espécies de plantas apresentam apenas pólen como recurso floral, sendo classificadas como flores de pólen (VOGEL, 1978), representando aproximadamente 6% das espécies de várias famílias de Angiospermas (BUCHMANN, 1983; VALLEJO-MARÍN et al., 2010). Mesmo ofertando apenas pólen como recurso floral, esse tipo de flor recebe visitas de uma grande diversidade de espécies de polinizadores dos mais variados grupos (WILLMER, 2011; TORRES, 2009; NASCIMENTO, 2017), sendo que as abelhas são os principais visitantes e mais eficientes na polinização.

A subtribo Cassiinae (Fabaceae) representada pelos gêneros *Senna*, *Cassia* e *Chamaecrista*, compartilham características morfológicas florais específicas (DE-PAULA, O.

C e OLIVEIRA, 2007; ALMEIDA et al. 2015a). O gênero *Senna* assim como os outros representantes do seu grupo, possuem flores de pólen, e compartilham a síndrome da melitofilia e o mecanismo de polinização por vibração ou “buzz-pollination” (CARVALHO e OLIVEIRA 2003; ALMEIDA et al. 2015). Neste mecanismo, as abelhas fêmeas contraem e relaxam os músculos de voo realizando vibrações nas anteras, a frequências adequadas para a liberação do pólen (BUCHMANN, 1983). Mesmo não possuindo a compreensão total de como ocorre a liberação de pólen sugere-se que a partir das vibrações o acúmulo de energia cinética, forças centrífugas e, talvez, as interações eletrostáticas possam contribuir em conjunto para a expulsão de pólen das anteras (CORBET & HUANG, 2014; VALLEJO-MARÍN, 2019). A vibração gerada pelas abelhas não tem apenas como única finalidade a coleta de pólen, mas também são usadas na comunicação (HRNCIR et al., 2008) e defesa (DE LUCA et al., 2014). Essas vibrações, mesmo sendo geradas pela musculatura do tórax, podem variar bastante em relação a frequência e duração na mesma abelha, até mesmo em visitas realizadas em flores da mesma planta (DE LUCA et al, 2014; 2018).

O pólen ofertado pelas flores de *Senna* é importante para as abelhas, devido ao seu potencial proteico essencial para a nutrição das suas larvas. No entanto, essas flores enfrentam um dilema uma vez que o pólen também deve ser direcionado para a polinização (De Luca & Vallejo-Marín 2013). Sendo assim, é necessário o máximo de aproveitamento e eficiência na deposição de pólen por parte das flores no corpo dos polinizadores.

Para a deposição eficiente do pólen em locais não alcançáveis pelas abelhas, algumas espécies de Cassiinae depositam o pólen de forma indireta no corpo dos polinizadores (WESTERKAMP, 2004; ALMEIDA et al. 2015; AMORIM et al. 2017). Esta deposição ocorre através de pétalas modificadas, com certo grau de concavidade, direcionadas ao lado oposto do gineceu. Dois mecanismos são descritos para essa forma de deposição de pólen. O primeiro é conhecido por ricochete, no qual o pólen das anteras de polinização é lançado contra a pétala modificada chocando-se três ou mais vezes, chegando ao dorso do polinizador (WESTERKAMP, 2004). O outro mecanismo, observado por Almeida et al. (2013a) em *Chamaecrista ramosa*, revela que o pólen percorre a superfície interna das pétalas modificadas por meio de um giro, sendo direcionado ao dorso do polinizador. Este mecanismo foi denominado de “looping” pelos autores.

1.3 DEPOSIÇÃO E EFICIÊNCIA DA CAPTURA DE PÓLEN

A partir de interações com os polinizadores, tornou-se imprescindível para as flores a apresentação de estruturas de maior resistência, a fim de suportar o estresse mecânico do contato

direto entre as flores e os animais (FIGUEIREDO, 2000). Desta forma, o desenvolvimento, especialmente das estruturas reprodutivas, tornou características morfológicas compatíveis à anatomia do agente biótico, evitando danos potenciais as estruturas e as mantendo finamente ajustada para um ótimo desempenho de polinização.

O gênero *Senna* apresenta modificações nas estruturas reprodutivas, tanto masculinas (androceu) como femininas (gineceu), que estão ligadas diretamente com sucesso reprodutivo. Essas plantas com flores hermafroditas, apresentam posição relativa dos órgãos sexuais, que podem mediar os padrões de deposição e captação de pólen nos corpos dos polinizadores (BARRETT, 2002).

Devido ao padrão de deposição e captação de pólen, em locais específicos e opostos no corpo do polinizador de flores enantiofilicas de *Senna*, essas espécies dependem da ocorrência de reciprocidade entre o posicionamento das estruturas reprodutivas de flores dos morfos direito e esquerdo (ALMEIDA 2012; ALMEIDA et al 2015). A reciprocidade floral está estritamente relacionada ao encaixe da flor no corpo do polinizador durante as visitas florais, de forma que haverá a deposição e captação de pólen respectivamente pelas anteras e estigma (JESSON et al. 2003a).

Os locais de deposição e captação de pólen variam em espécies de *Senna*, podendo ocorrer do tórax ao abdômen, dependendo das espécies, devido a diversidade na morfologia e posicionamento das estruturas (ALMEIDA et al. 2015a; ALMEIDA et al. 2015b). De acordo com Solís-Montero e Vallejo-Marín (2017), em estudos com *Solanum rostratum* a fim de avaliar a influência da morfologia das abelhas na dinâmica da transferência de pólen e formação de fruto, constataram esse como um fator importante, onde espécies com um tamanho médio a grande porte (4-20mm) proporcionaram percentual de formação de frutos significativamente maior. Os mesmos autores observaram que grandes quantidades de pólen no estigma têm efeito negativo na geração de sementes, podendo a carga de pólen estar contaminada com pólen interespecífico.

Já em um estudo realizado por Cresswell (2000) avaliando a influência da morfologia do pistilo na eficiência de captação de pólen, realizaram testes com pistilos manipulados de diferentes tamanhos e constataram que flores com pistilo intermediário receberam a maioria do pólen em seus estigmas. Este estudo indicou que o comprimento ideal do pistilo é 11.3 a 0.14mm, e que pequenos desvios deste comprimento resultam em uma redução de 10% na captação de pólen.

Além de apresentar morfologias variadas, alguns estudos (DULBERGER et al., 1994; MARAZZI, 2007; ARCEO-GÓMEZ et al. 2011) indicam que em algumas espécies de Cassiinae a superfície estigmática é protegido por uma franja de tricomas tendo o tamanho e o

número variando de acordo com as espécies. Esta estrutura tem a função de proteger a superfície do estigma de pólen indevido. Sigrist & Sazima (2004) e Arceo-gómez et al. (2011) constataram que essa cobertura é removida mecanicamente pela vibração gerada pelos polinizadores durante a visita, dando início à receptividade estigmática e aumentando o contato do pólen com estigma, tendo assim maior sucesso na captação.

Desta forma, entende-se que flores enantiostílicas são bem adaptadas e dependentes da vibração dos seus polinizadores para a liberação de pólen das anteras e processos de deposição de pólen no corpo das abelhas, além da necessidade para elevar a eficiência da captação de pólen pelo estigma (ARCEO-GÓMEZ et al. 2011).

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA NM, CASTRO CC, LEITE AV, NOVO RR, MACHADO IC. Enantiostyly in *Chamaecrista ramosa* (Fabaceae-Caesalpinioideae): floral morphology, pollen transfer dynamics and breeding system. **Plant Biology** 15: 369-375. 2013a.

ALMEIDA NM, CASTRO CC, LEITE AV, NOVO RR, MACHADO IC. Floral polymorphism in *Chamaecrista flexuosa* (Fabaceae-Caesalpinioideae): a possible case of atypical enantiostyly? **Annals of Botany** 112: 1117–1123. 2013b.

ALMEIDA NM, SOUZA JT, OLIVEIRA CRS, BEZERRA TT, NOVO RR, SIQUEIRA-FILHO JA, OLIVEIRA PE, CASTRO CC. Functional dimorphic enantiostyly in monomorphic enantiostylous species of the subtribe Cassiinae (Fabaceae-Caesalpinioideae). **Plant Biology** 20: 797–801. 2018.

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., Rabbam, A. R. C., and Siqueira Filho, J.A. (eds.), *Ecologia da Caatinga: Curso de Campo*. 2011. **Grafica Printpex**, pp. 353-366, 2012.

ALMEIDA, N. M. et al. Breeding systems of enantiostylous Cassiinae species (Fabaceae, Caesalpinioideae). **Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 215, p. 9–15, ago. 2015a.

ALMEIDA, N. M., & DE CASTRO, C. C. Enantiostyly in Angiosperms. *Asymmetry in Plants: Biology of Handedness*, 319. 2019.

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*, 17(3), 740-745. 2015b.

ALMEIDA, N. M., SOUZA, J. T., OLIVEIRA, C. R. S., BEZERRA, T. T., NOVO, R. R., SIQUEIRA FILHO, J. A. & CASTRO, C. C. Functional dimorphic enantiostyly in monomorphic enantiostylous species of the subtribe Cassiinae (Fabaceae-Caesalpinioideae). *Plant Biology*, 20(4), 797-801. 2018.

AMORIM T, MARAZZI B, SOARES A.A, FORNI-MARTINS ER, MUNIZ CR, WESTERKAMP C. Ricochet pollination in *Senna* (Fabaceae) - petals deflect pollen jets and promote division of labour among flower structures. *Plant Biology* 19(6): 951-962. 2017.

ARCEO-GÓMEZ, G. et al. Anther and stigma morphology in mirror-image flowers of *Chamaecrista chamaecristoides* (Fabaceae): implications for buzz pollination. *Plant Biology*, v. 13, n. SUPPL. 1, p. 19–24, jan. 2011.

ARMBRUSTER, W. S et al. The adaptive accuracy of flowers: measurement and microevolutionary patterns. *Annals of Botany*, v. 103, n. 9, p. 1529-1545, 2009.

BAKER, A. M., THOMPSON, J. D. e BARRET, S. C. H. Evolution and maintenance of stigma-height dimorphism in *Narcissus*. II. Fitness comparisons between style morphs. *Heredity*. 514-524. 2000.

BARRETT, S.C.H.. The evolution of plant sexual diversity. *Nature Reviews Genetics*. 3: 274–284, 2002.

BUCHMANN, S. L. Buzz pollination in angiosperms. In JONES C. E. & LITTLE R. J. (Eds.), *Handbook of experimental pollination biology*. New York: **Scientific and Academic Editions**. pp. 73– 113, 1983.

BUCHMANN, S.L. Buzz pollination of *Cassia quiedondilla* (Leguminosae) by bees of the genera *Centris* and *Melipona*. *Bull S Calif Acad Sci* 73:171–173. 1974.

BURKART A, K LUNAU, C SCHLINDWEIN. Comparative bioacoustical studies on flight and buzzing of neotropical bees. *Journal of Pollination Ecology* 6: 118-124. 2011.

CARVALHO, D. A.; OLIVEIRA, P. E. Biologia reprodutiva e polinização de *Senna sylvestris* (Vell.) H.S. Irwin & Barneby (Leguminosae, Caesalpinioideae). *Revista Brasileira de Botânica*, v. 26, n. 3, p. 319–328, 2003.

- COELHO, C. P. et al. Sistema reprodutivo, distília e graus de reciprocidade em rubiaceae arbustivas do sub-bosque de formações florestais do cerrado. 2013.
- CORBET, S. A., HUANG, Shuang-Quan. Polinização por zumbido em oito espécies de *Pedicularis* polinizadas por zangões: envolve a carga triboelétrica de grãos de pólen induzida por vibração ?. **Annals of botany**, v. 114, n. 8, pág. 1665-1674, 2014.
- CRESSWELL, J. E. Manipulation of female architecture in flowers reveals a narrow optimum for pollen deposition. **Ecology**, v. 81, n. 11, p. 3244-3249, 2000.
- DE LUCA PA, VALLEJO-MARÍN M. What's the buzz about? The ecology and evolutionary significance of buzz-pollination. **Curr Opin Plant Biol**. 16(4):429–435. 2013.
- DE LUCA, P. A. et al. How well do acoustic recordings characterize properties of bee (*Anthophila*) floral sonication vibrations?. **Bioacoustics**. 2018.
- DE LUCA, P.A., COX, D.A., VALLEJO-MARÍN M. Comparison of pollination and defensive buzzes in bumblebees indicates species-specific and context-dependent vibrations. **Naturwissenschaften**. 101(4):331–338, 2014.
- DE-PAULA, O. C; OLIVEIRA, D. M. T. Variação da estrutura carpelar em seis espécies de *Cassiinae* (Leguminosae: Caesalpinioideae). **Acta botanica brasílica**, v. 21, n. 4, p. 915-925, 2007.
- DULBERGER R. The floral biology of *Cassia didymobotrya* and *C. auriculata* (Caesalpinaceae). **American Journal of Botany**, 68, 1350–1360. 1981.
- DULBERGER, R., SMITH, M.B., BAWA, K.S. The stigmatic orifice on *Cassia*, *Senna* and *Chamaecrista*: morphological variation, function during pollination and possible adaptive significance. **American Journal of Botany**, 81, 1390–1396. 1994
- FENSTER C.B., ARMBRUSTER WS, WILSON P, DUDASH MR, THOMSON J.D. Pollination Syndromes and Floral Specialization. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**. 35:1, 375-403. 2004.
- FIGUEIREDO, R. A. Biologia Floral de Plantas Cultivadas. Aspectos teóricos de um tema praticamente desconhecido no Brasil. **Revista Argumento**, v. 2, n. 3, p. 8-27, 2000.
- GOTTSBERGER G, I SILBERBAUER-GOTTSBERGER. Evolution of flower structures and pollination in Neotropical *Cassiinae* (Caesalpinaceae) species. *Phyton* (Horn) 28:293–320. 1988.

HERRERA C.M. Floral traits and plant adaptation to insect pollinators: a devil's advocate approach. In: Lloyd D.G., Barrett S.C.H. (Eds), *Floral biology: studies on floral evolution in animalpollinated plants*. Chapman & Hall, New York, USA: pp 65–87. 1996.

HESLOP-HARRISON, Y. Control gates and micro-ecology: the pollen–stigma interaction in perspective. *Annals of Botany*, 85, 5–13. 2000.

HRNCIR, M. et al. Thoracic vibrations in stingless bees (*Melipona seminigra*): resonances of the thorax influence vibrations associated with flight but not those associated with sound production. **Journal of Experimental Biology**, v. 211, n. 5, p. 678-685, 2008.

JESSON, L. K. et al. The development of enantiostyly. **American Journal of Botany**, v. 90, n. 2, p. 183–195, 2003a.

JESSON, L.K, BARRETT, S.C.H. Enantiostyly in *Wachendorfia* (Haemodoraceae): The influence of reproductive systems on the Maintenance of the polymorphism. **American Journal of Botany** 89(2): 253–262. 2002.

JESSON, L.K., BARRETT, S.C.H. The comparative biology of mirror-image flowers. **International Journal of Plant Science** 164(5 Suppl.): 237–249, 2003c

MARAZZI B., CONTI E., ENDRESS P.K. Diversity in anthers and stigmas in the buzz-pollinated genus *Senna* (Leguminosae, Cassinae). **International Journal of Plant Sciences**, 168, 371–391. 2007.

NASCIMENTO, E. A. do; DEL-CLARO, K. Floral visitors of *Chamaecrista debilis* (Vogel) Irwin & Barneby (Fabaceae-Caesalpinioideae) at cerrado of Estação Ecológica de Jataí, São Paulo State, Brazil. **Neotropical entomology**, v. 36, n. 4, p. 619-624, 2007.

OLLERTON, J; WINFREE, R; TARRANT, S. How many flowering plants are pollinated by animals?. **Oikos**, v. 120, n. 3, p. 321-326, 2011.

PROCTOR, M.; YEO, P.; LACK, A. The natural history of pollination. Oregon. **Editora Timber Press**, 1996.

QUEIROZ, L. P. Leguminosas da Caatinga. 2018. <https://docero.com.br/doc/x10xe8>.

SANTOS, T. T.; OLIVEIRA, A. C. S.; QUEIROZ, R. T.; SILVA, J. S. O gênero *Senna* (Leguminosae-Caesalpinioideae) no município de Caetité, Bahia, Brasil. **Rodriguésia** 71: e01222018. 2020.

- SIGRIST M.R., SAZIMA M. Pollination and reproductive biology of twelve species of Neotropical Malpighiaceae: stigma morphology and its implications for the breeding system. **Annals of Botany**, 94, 33–41. 2004.
- SOLÍS-MONTERO, L., VALLEJO-MARÍN, M. Does the morphological fit between flowers and pollinators affect pollen deposition? An experimental test in a buzz-pollinated species with anther dimorphism. **Ecology and Evolution**, v. 7, n. 8, p. 2706-2715, 2017.
- SOUZA, V. C.; BORTOLUZZI, R. L. C. *Senna aversiflora*. In Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB19054>>. Acesso em julho 2020.
- STUDER, A.; NUSBAUMER, L.; SPICHIGER, R. Biodiversidade da Reserva Biológica de Pedra Talhada. **Genève**, 1-818. 2015.
- SUTHERLAND, S. & DELPH, L. F. On the importance of male fitness in plants: patterns of fruit-set. **Ecology**, 65(4), pp. 1093-1104. 1984.
- TORRES, M. W. Biologia reprodutiva e polinização de *Senna multijuga* no Parque Nacional de Itatiaia e na Área de Proteção Ambiental da Serrinha do Alambari. 2009. Tese de Doutorado. Dissertação de Mestrado. IPJBRJ, Rio de Janeiro. 49p.
- VALLEJO-MARÍN, M. Polinização por zumbido: estudo das vibrações das abelhas nas flores. **New Phytologist**, v. 224, n. 3, pág. 1068-1074, 2019.
- VALLEJO-MARÍN, M., DA SILVA, E. M., SARGENT, R. D., & BARRETT, S. C. H. Trait correlates and functional significance of heteranthery in flowering plants. **New Phytologist**, 188, 418–425, 2010
- VOGEL S. Evolutionary shifts from reward to deception in pollen flowers. In The pollination of flowers by insects (A.J. Richards, ed.). **Academic Press, London**. 1978.
- WESTERKAMP, C. Ricochet pollination in Cassias—and how bees explain enantiostyly. Solitary bees: conservation, rearing and management for pollination. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2004. p. 225–230.
- WILLMER, P. Pollination and floral ecology. **Princeton University Press**, 2011.
- RECH, A. R.; BERGAMO, P. J.; FIGUEIREDO, R. A. Polinização abiótica. **Biologia da polinização**, p. 183-204, 2014.

CAPÍTULO 1:

**Proporção de morfos e posicionamento de estiletes de flores enantiostílicas
monomórficas de Cassiinae (Leguminosae)**

Manuscrito a ser submetido ao periódico Flora

Fator de impacto 2.088

Normas para submissão:

https://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/701764?generatepdf=true

Proporção de morfos florais e variação no posicionamento de estiletos em espécies enantiostílicas monomórficas de Cassiinae (Leguminosae)

José Ronaldo Ferreira de Lima^{1*}; Charlane Silva²; Raphael Matias⁵;
Vinícius L. G. Brito^{4,5}; Cibele Cardoso de Castro^{1,6}; Natan Messias
Almeida^{1,7}

¹Programa de Pós Graduação em Biodiversidade. Universidade Federal Rural do Pernambuco, Avenida Dom Manuel de Medeiros, s/n, Recife, Pernambuco, Brasil, 52171-900.

²Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal. Universidade Federal de Pernambuco. Avenida Professor Moraes Rego, 1235, Recife, Pernambuco, 50670-901.

³Instituto Tecnológico Vale, Belém, PA, 66055-090

⁴Programa de Pós-Graduação Em Biologia Vegetal, Universidade Federal de Uberlândia, Campus Umuarama, Uberlândia, MG 38400-902.

⁵Universidade Federal de Uberlândia, Rua Ceará sn, Uberlândia, Minas Gerais, 38408-100.

⁶ Universidade Federal do Agreste de Pernambuco. Avenida Bom Pasto, s/n, Garanhuns, Pernambuco, Brasil. 55292-272

⁷ Universidade Estadual de Alagoas, Campus III, Rodovia AL 105, s/n, Graciliano Ramos, Palmeira dos Índios, Brasil, 57600005

*Autor de correspondência: ronaldolima1997@gmail.com

RESUMO

Espécies enantiostílicas comumente apresentam proporções similares entre morfos florais direito e esquerdo nas populações. Entretanto, em espécies de Cassiinae, avaliações que incluem morfologia e funcionalidade do posicionamento do estilete mostram que tal proporção pode ser alterada. Nosso estudo teve como objetivo investigar a proporção de morfos florais a partir da avaliação morfológica e funcional em três espécies de Cassiinae. Nossa hipótese é que a proporção entre morfos é semelhante na avaliação morfológica, e distinta na avaliação funcional, com a presença de morfo central. O estudo foi realizado na Reserva Biológica de Pedra Talhada, um remanescente de Mata Atlântica no nordeste do Brasil. Foram estudadas as espécies enantiostílicas monomórficas *Chamaecrista fasciculata*, *Senna uniflora*, *S. aversiflora*. A partir de fotografias frontais, as flores foram classificadas em morfológicamente direitas (MD) e esquerdas (ME), tomando como referência o posicionamento da pétala diferenciada, e em funcionalmente esquerdas (FE), direitas (FD) e centrais (FC), observando o afastamento horizontal do estigma. Nossos dados mostram que, na avaliação morfológica, a proporção de flores esquerdas e direitas foi semelhante. No entanto, os morfos FE, FC e FD ocorreram em proporções diferentes em todas as espécies, com a variação e sobreposição do posicionamento do estigma dos morfos MD e ME ocorrendo de forma distinta nas três espécies. Os resultados observados corroboram a nossa hipótese e indicam o que parece ser um padrão na proporção de morfos florais em espécies enantiostílicas monomórficas de Cassiinae. Por outro lado, a alta variação e sobreposição dos posicionamentos dos estiletos precisa ser melhor investigada para termos o real entendimento das pressões seletivas que as conduziram também sua funcionalidade, podendo ter como significado um maior aproveitamento do pólen no corpo do polinizador.

Palavras chaves: Isopleitia; sobreposição de morfos; funcionalidade.

INTRODUÇÃO

Flores de espécies enantiostílicas apresentam variação no posicionamento do estilete, podendo estar direcionado a direita (morfo direito) ou a esquerda (morfo esquerdo) do eixo de simetria floral (BARRETT *et al*, 2000; JESSON; BARRETT, 2002, ALMEIDA *et al*, 2013b). Normalmente, a deflexão do estilete é acompanhada de forma oposta pelos estames (BARRETT *et al*, 2000; JESSON; BARRETT, 2002, ALMEIDA *et al*, 2013a). Essa arquitetura floral leva a uma disposição recíproca das estruturas reprodutivas entre os morfos, gerando um padrão também recíproco de deposição e captura de pólen no corpo dos polinizadores, potencializando o fluxo polínico intermorfo (BARRETT *et al*, 2000; ALMEIDA *et al*, 2013a; 2015).

Parte das espécies da subtribo Cassiinae (e.g., espécies de *Cassia*, *Senna* e *Chamaecrista*) apresentam enantiostilia monomórfica, com os indivíduos apresentando os dois morfos florais. Os indivíduos podem apresentar inflorescências com apenas um dos morfos ou inflorescências tanto com flores direitas quanto com esquerdas, distribuídas de forma aleatória ou seguindo algum padrão (BARRETT *et al*. 2000; JESSON *et al*. 2003a; ALMEIDA, 2013a), além disso possuem as pétalas superiores mais ou menos reduzidas e as inferiores côncavas e/ou modificadas em forma e tamanho (IRWIN & BARNEBY, 1982; MARAZZI *et al.*, 2006). Nestes casos, as flores possuem uma ou mais pétalas que participam da deposição de pólen no corpo dos polinizadores (WESTERKAMP, 2004, ALMEIDA *et al*, 2013a; 2013b; 2015a; 2015b Amorim *et al*. 2017).

Geralmente, as espécies enantiostílicas possuem anteras poricidas que necessitam da vibração exercida por abelhas para a liberação dos grãos de pólen. Após a vibração, parte dos grãos é direcionada para as pétalas que, por ricochete (ver AMORIM *et al*. 2017) ou looping (ver Almeida *et al*. 2013a), depositam o pólen, no lado oposto ao estilete, no corpo dos polinizadores (ALMEIDA *et al*, 2013b; 2015a; 2015b). Devido a esta especificidade, flores de Cassiinae podem ser definidas como direitas e esquerdas a partir da observação do posicionamento destas pétalas, que ficam opostas ao estilete (ALMEIDA *et al*. 2013b). Desta forma, flores direitas possuem pétalas modificadas posicionadas a esquerda do eixo de simetria floral e o inverso para flores esquerdas (ALMEIDA *et al*, 2013a, b; 2015a; 2015b).

Considerando as particularidades de Cassiinae, Almeida *et al*. (2013b) investigou a proporção de morfos florais em *Chamaecrista flexuosa* em duas vias. Primeiro, o morfo

foi determinado pela posição da pétala (morfologia) e, posteriormente, pela posição do estilete/estigma (funcionalidade). Morfologicamente, as flores direitas e esquerdas de *C. flexuosa* ocorreram em proporção de 1:1 nas populações estudadas. No entanto, quando avaliadas pela funcionalidade, a proporção de flores de cada morfo não foi semelhante. Isso porque existe uma alta variação na posição do estilete entre as flores de *C. flexuosa*, resultando, inclusive, na identificação do morfo central (estilete/estigma posicionado no centro floral), conferindo uma atipicidade na enantiofilia dessa espécie. Além disso, os autores observaram que 73,38% das flores do morfo central eram classificadas, a partir do posicionamento da pétala, como direitas. Esse resultado demonstra uma maior tendência de flores morfologicamente direitas perderem a funcionalidade de captura dos grãos de pólen (ALMEIDA et al. 2013b).

Apesar da importância deste relato para melhor entender aspectos funcionais e evolutivos das espécies enantiofilas, a ocorrência desta atipicidade não foi investigada em outras espécies de Cassiinae, até o presente momento. Desta forma, esse estudo teve como objetivo investigar a proporção de morfos florais a partir da avaliação morfológica e funcional em três espécies de Cassiinae, além de analisar a variação e sobreposição no posicionamento dos estigmas dos diferentes morfos florais. Norteando-se pelas respectivas perguntas P1) A proporção dos diferentes morfos florais (critério morfológico e funcional) dentro dos indivíduos ocorre em equilíbrio nas espécies?; P2) Qual a variação na posição do estigma nas flores de um mesmo indivíduo e entre os indivíduos?

MATERIAIS E MÉTODOS

Área de estudo

O estudo foi realizado na Reserva Biológica de Pedra Talhada, um remanescente de Mata Atlântica (450 e 900 m de altitude) localizado entre os estados de Pernambuco e Alagoas, nordeste do Brasil (36°22' a 36°28'; 9°11' a 9°16'). A unidade de conservação ocupa uma área de 4.500 ha, abrangendo parte dos municípios de Lagoa do Ouro-PE, Quebrangulo e Chã Preta-AL (STUDER et al., 2015). O clima da região é tropical quente e chuvoso com verão seco do tipo As', segundo a classificação de Köppen. A estação pluviométrica indica uma precipitação anual média de 1.628mm. Os meses com maiores precipitações são maio, junho e julho com mais de 250mm/mês. A estação mais seca se estende de outubro a fevereiro com menos de 50mm/mês (STUDER et al. 2015).

Espécies estudadas

Foram estudadas três espécies da subtribo Cassiinae, sendo elas: *Chamaecrista fasciculata*, *Senna uniflora* e *S. aversiflora* (fig.1). Estas espécies compartilham características florais específicas (DE-PAULA & OLIVEIRA, 2007; ALMEIDA *et al.* 2015), tais como flores de pólen, apresentando cinco pétalas com coloração amarela e anteras poricidas (FENSTER, 1991; FENSTER, 1995).. As três espécies apresentam enantiostilia monomórfica, na qual o mesmo indivíduo produz flores direitas e esquerdas (BARRETT, 2002, SANTOS, 2020).

Caracterização morfo-funcional dos morfos florais

Posicionamento da pétala diferenciada

Para cada espécie, foram selecionadas 10 flores por indivíduo (10 indivíduos por espécie; n=100 flores) para análise do posicionamento da pétala diferenciada. A análise foi feita a partir de fotografias frontais padronizadas, sendo as flores classificadas em direitas e esquerdas, tomando como referência o direcionamento do posicionamento da pétala diferenciada em relação ao eixo de simetria floral (ALMEIDA *et al.* 2013b). Quando a pétala estava posicionada à direita do eixo de simetria floral, a flor foi considerada esquerda e o inverso para a direita (ALMEIDA *et al.* 2013b).

Posicionamento e variação na posição do estigma

Utilizando as mesmas flores e fotografias da avaliação anterior, o afastamento horizontal do estigma em relação ao eixo de simetria da flor foi medido através do software imageJ tendo referência das escalas mantidas nas fotos e as flores foram classificadas em esquerdas, direitas e centrais (adaptado de ALMEIDA *et al.* 2013b). Atribuímos o valor “0” para o eixo central da flor, de modo que valores negativos indicavam estigmas posicionados mais à esquerda e valores positivos indicavam estigmas mais à direita do centro floral. De acordo com a posição do estigma na flor, foi estabelecido três morfos florais dentro de cada espécie (central, esquerdo e direito). Para *C. fasciculata*, flores esquerdas foram classificadas quando os estigmas tinham valores negativos acima de -0,85mm, flores direitas com valores acima de 0,85mm e flores

centrais com intervalo de -0,85 e 0,85mm. Para *S. uniflora*, flores esquerdas tinham estigmas com valores negativos acima de -1,1mm, flores direitas acima de 1,1mm e flores centrais com valores entre -1,1 e 1,1mm. Já para *S. aversiflora*, que possui uma maior variação na posição do estigma, flores esquerdas tinham estigmas com valores negativos acima de -3mm, flores direitas acima de 3mm e flores centrais com valores variando entre -3 e -3mm (adaptado de ALMEIDA *et al.* 2013b). Essas categorias para classificação dos morfos florais foram determinadas pela amplitude do posicionamento do estigma na flor em relação ao eixo central de cada espécie (ALMEIDA *et al.* 2013b; BRAGA, 2021).

Análise estatística

Modelos lineares generalizados de efeitos mistos (GLMMs) foram realizados para avaliar se os tipos florais morfológicos (esquerdo e direito) e funcionais (esquerdo, direito e central) estavam balanceados dentro dos indivíduos de cada espécie estudada (isoplético). GLMMs foram realizados usando a função "glmer" no pacote "lme4" em R (Bates et al. 2018). O tipo floral foi incluído nos modelos como um fator fixo e a proporção de flores por indivíduo foi modelada assumindo uma distribuição binomial com uma função de ligação "logit". Plantas individuais foram incluídas como um fator aleatório. Para obter a significância estatística dos modelos, nós realizamos uma análise de variância tipo II usando a função "Anova" do pacote "car" (Fox & Weisberg, 2018). Um teste post hoc foi usado para investigar as diferenças entre os tipos florais funcionais com ajustes para comparações múltiplas usando o método bonferroni e função "lsmeans" do pacote "emmeans" (Lenth et al. 2019).

Posteriormente, a mudança de funcionalidade nas flores morfológicamente esquerda e direita foi analisada dentro de cada espécie. Para tanto, foi criado um termo de interação utilizando tipo morfológico (dois grupos) e tipo funcional (três grupos) para criar uma nova variável com seis grupos. Em seguida, usamos isso como uma variável preditora em GLMMs em que a proporção de flores era a variável de resposta; indivíduos foram incluídos como um fator aleatório. A importância da preditora variável foi testada com análise de variância tipo II e teste post hoc conforme descrito acima.

Para identificar diferenças entre tipos morfológicos de variação na distância horizontal dos estigmas dentro dos indivíduos (variação intra-individual), modelos

lineares de efeitos mistos (LMMs) foram conduzidos usando a função "lmer" no pacote "lme4" (Bates et al. 2018) como medida de variação intra-individual, usamos o coeficiente de variação ($CV = \text{desvio padrão} / \text{média} * 100$). O CV na posição dos estigmas por indivíduo foi utilizado como variável resposta nos modelos e o tipo floral foi incluído como fator fixo; indivíduos foram incluídos como um fator aleatório. A significância do fator fixo (variável preditora) foi testada com a análise de variância do tipo II, conforme descrito acima. A análise de resíduos foi usada para garantir que os pressupostos do modelo foram atendidos (homocedasticidade e distribuição normal). Valores de CV acima de 30% foram considerados muito altos, indicando baixíssima precisão no posicionamento do estigma.

Usando nossa amostra de flores, a distribuição de frequência da posição do estigma (medida da distância horizontal) em cada tipo floral morfológico foi determinada usando um intervalo de 0,4 mm. Estimamos a razão de sobreposição entre as distribuições da posição do estigma entre as flores esquerda e direita dentro de cada espécie. Para isso, utilizamos funções familiares normais para ajustar as distribuições e os parâmetros foram estimados pelo método de máxima verossimilhança (ML). Posteriormente, essa mesma análise foi realizada para cada planta individual para estimar a sobreposição intra-individual. Todas as análises neste estudo foram realizadas no ambiente estatístico R (R Development Core Team, 2021).

RESULTADOS

As proporções de flores esquerda e direita dentro dos indivíduos de cada uma das três espécies não se desviaram significativamente do equilíbrio predito de 1: 1 (*S. aversiflora*: média \pm SE, flores esquerdas: $0,487 \pm 0,057$, flores direitas: $0,513 \pm 0,057$; $\chi^2 = 0,020$; $df = 1$; $p = 0,887$; *S. uniflora*: flores da esquerda: $0,510 \pm 0,046$, flores da direita: $0,490 \pm 0,046$; $\chi^2 = 0,080$; $df = 1$; $p = 0,777$; *C. fasciculata*: flores da esquerda: $0,530 \pm 0,030$, flores da direita: $0,470 \pm 0,030$; $\chi^2 = 0,719$; $df = 1$; $p = 0,396$). No entanto, os tipos florais funcionais baseados no posicionamento do estigma (esquerdo, central e direito) ocorreram em proporções significativamente diferentes em todas as espécies (Fig. 2). Indivíduos de *S. aversiflora* apresentaram maior proporção de flores funcionalmente centrais e esquerdas (Fig. 2). Em *S. uniflora*, os indivíduos apresentaram maior proporção de flores centrais e menor proporção de flores esquerdas (Fig. 2). Por fim, os indivíduos

de *C. fasciculata* apresentaram maior proporção de flores centrais e direitas, mas a proporção de flores direitas e esquerdas dentro de indivíduos não diferiu significativamente (Fig. 2).

As flores à direita e à esquerda, com base na caracterização morfológica, variaram em termos de funcionalidade devido à variação da curvatura do estilo (Fig. 3). Em *S. aversiflora*, as flores exibiram variação substancial na posição do estigma. A proporção de flores com estilos desviados para a esquerda, central e direita foram semelhantes nos dois tipos morfológicos (Fig. 3). Em *S. uniflora*, as flores morfológicas esquerdas tinham estigmas mais frequentemente colocados na posição central do eixo floral (Fig. 3). Nessa mesma espécie, as flores morfológicamente corretas apresentaram maior proporção de flores com estilos defletidos à direita e central, sem diferenças entre esses dois tipos funcionais (Fig. 3). Em *C. fasciculata*, a posição dos estigmas correspondeu melhor à caracterização morfológica do que em *S. aversiflora* e *S. uniflora*. As flores morfológicamente esquerdas de *C. fasciculata* eram mais frequentemente estilizadas para a esquerda e centralmente defletidas, enquanto as flores morfológicas para a direita eram mais estilizadas para a direita e para o centro (Fig. 3). No entanto, a proporção de flores funcionalmente esquerdas e centrais é estatisticamente semelhante dentro do tipo morfológico direito (Fig. 3).

Todas as espécies apresentaram indivíduos com alta variação na distância horizontal dos estigmas ($CV > 30\%$; Fig. 4). Essa variação intra-individual foi alta na maioria dos indivíduos de *S. aversiflora*, sem diferenças estatisticamente significativas entre os tipos florais (fig. 4). Em *S. uniflora*, a maioria dos indivíduos apresentou maior variação nas flores morfológicamente esquerdas, com diferenças significativas entre os tipos florais (Fig. 4). Para *C. fasciculata*, a variação intra-individual entre as flores direita e esquerda foi estatisticamente semelhante (fig. 4).

Diferentemente do esperado para uma espécie enantiostilicas típica, algumas espécies e indivíduos estudados apresentaram uma alta sobreposição na posição dos estigmas entre flores morfológicamente direita e esquerda (Fig. 5). Na população de *S. aversiflora*, 90,1% da distribuição da posição do estigma nas flores direitas coincidiu com a das flores esquerdas (Fig. 5). Essa alta sobreposição ocorreu no nível intra-individual, com 80% dos indivíduos apresentando sobreposição maior que 61% (amplitude: 25,5-92,3%; Fig. S2). Da mesma forma, houve sobreposição considerável (81,1%; fig. 5) na posição do estigma entre as flores direita e esquerda na população de *S. uniflora*. Embora

esta espécie tenha mostrado uma grande variação no nível de sobreposição entre os indivíduos (amplitude: 7,8- 92,4%), 60% deles tinham sobreposição maior que 61% (fig. S3). A sobreposição na população de *C. fasciculata* foi substancialmente menor (29,1%) em comparação com as duas espécies de *Senna* (Fig. 5). Também houve baixa sobreposição na maioria dos indivíduos estudados, com 70% deles apresentando sobreposição inferior a 29% (amplitude: 0,4- 76,6%; Fig. S4).

DISCUSSÃO

Neste estudo, avaliamos a proporção dos morfos florais, classificados pelo posicionamento da pétala diferenciada e posicionamento dos estigmas, em *C. fasciculata*, *S. uniflora* e *S. aversiflora*. As espécies apresentaram razão 1:1 de flores direitas e esquerdas classificadas pelo posicionamento da pétala, mas desviaram dessa proporção quando se considera o posicionamento do estigma. Além disso, observamos estigmas centrais e sobrepondo morfos contrários em flores com pétalas à direita e esquerda, em proporções distintas.

Apesar desconhecimento das bases genéticas e/ou fatores ambientais que podem mediar a produção dos morfos florais em populações enantioestílicas monomórficas, é esperado que flores direitas e esquerdas (baseado no posicionamento da pétala) ocorram em proporção semelhante nas populações (BARRETT, 2002; ALMEIDA & CASTRO, 2019). Neste sentido, nossos resultados confirmam estas expectativas, apontando a isopletia nas populações estudadas, sendo semelhantes aos de outros estudos envolvendo a avaliação de produção de morfos em populações enantioestílicas monomórficas (TANG & HUANG, 2005; ALMEIDA et al., 2013a, b; ALMEIDA et al., 2018). Nestes estudos, a expressão semelhante no número de flores dos dois morfos é justificada como uma estratégia necessária para o maior sucesso reprodutivo das espécies, devido a obrigatoriedade dos cruzamentos intermorfos apresentado por espécies enantioestílicas monomórficas.

Os resultados obtidos em nosso estudo mostram que a proporção de morfos não se apresenta semelhante quando consideramos o posicionamento dos estigmas, coincidindo com o encontrado por Almeida et al. (2013), assim, como a existência frequente de um terceiro morfo floral (central). Sendo assim, a isopletia baseada no posicionamento da pétala, atribuída a estas espécies, seria virtual, uma vez que a funcionalidade de captura

de grãos de pólen em lados opostos no corpo dos polinizadores (parte da definição da enantioestilia) não é representada em proporção semelhante. As espécies enantioestílicas se beneficiam da existência de morfos recíprocos e em proporções semelhantes, possibilitando aumento nas taxas de xenogamia (BARRETT, 2002; ALMEIDA & CASTRO, 2019). Em nosso estudo, pelas flores apresentarem uma grande variação no posicionamento dos estigmas e consequente ocorrência do morfo central, entendemos que, a área de captura de grãos de pólen no corpo dos polinizadores é aumentada para ambos os morfos. Isso pode levar a uma menor competição dos estigmas por pólen, assim como propuseram Almeida et al. (2013). Em estudo realizado por Braga (2021), com a espécie enantioestílica monomórfica *S. rugosa*, foi observado a existência da funcionalidade central, além de alta variação no posicionamento das estruturas reprodutivas. Contudo, mesmo com a variação observada, estigmas e anteras de flores de diferentes indivíduos mantiveram-se com alta reciprocidade, o que mantém a promoção da xenogamia, principal funcionalidade da enantioestilia.

Outras espécies possuem variações na expressão das estruturas reprodutivas e sistema reprodutivo (HAMILTON, 1990). Essa variação pode aparecer como caráter exclusivo de uma população ou espécie, ou dentro de uma população (COELHO & BARBOSA, 2003; CONSOLARO, 2008), o que pode afetar o fluxo de pólen entre os morfos (ENDELS et al. 2002). Nestes casos, estas variações podem ser atribuídas a perturbações causadas pela perda e fragmentação de habitats (ENDELS et al. 2002). Em espécies enantioestílicas, não existem estudos que relacionem a fuga do padrão enantioestílicos a perturbações ambientais. Por outro lado, a maior flexibilidade no posicionamento do estigma em relação ao eixo floral, apresentado por estas espécies, como promover melhor aproveitamento na coleta de pólen nos corpos dos polinizadores é referenciado para espécies enantioestílicas de Cassiinae (ALMEIDA et al. 2013; ALMEIDA et al. 2015; ALMEIDA & CASTRO 2019).

Da mesma forma, a presença de estigmas próximos ao centro floral (morfo central), em nosso estudo, reforça a ideia do aumento da área de captura e consequente diminuição da competição dos estigmas por grãos de pólen. Flores determinadas como centrais foram as mais numerosas dentro dos indivíduos de *S. uniflora*, *S. aversiflora* (juntamente flores esquerdas) e *C. fasciculata* (juntamente com flores direitas). A estratégia de produção de flores em *S. aversiflora* foi semelhante a observada em *C. flexuosa* (ALMEIDA et al. 2013), a qual produziu flores centrais e esquerdas em maior número. A maior representação do morfo central pode significar um fator adaptativo que impulsiona a

autopolinização, por apresentar maior proximidade com as anteras (ALMEIDA et al. 2013; MORAIS et al. 2020). Por outro lado, são necessários mais estudos que investiguem quais os fatores (e.g. ambientais, genéticos) que conduzem a estas diferentes estratégias, em relação a representação dos morfos esquerdo e direito. Avaliações das interações destas plantas com seus polinizadores e partilha deles com espécies de plantas sincronopátricas podem gerar pistas das pressões responsáveis por estas variações.

As diferenças nas proporções dos morfos direito, esquerdo e central, avaliados a partir do posicionamento do estigma, pode representar uma assimetria no fluxo de pólen, favorecendo uma maior produção de frutos de determinado morfo. Casos de assimetria no fluxo polínico já foram detectadas em espécies com outros polimorfismos florais (GARCÍA- LAU & BOSQUE 2003; ROBLEDO 2008). Na espécie distílica *Arcytophyllum lavarum*, a assimetria no fluxo de pólen reduziu pela metade o número de sementes produzidas nos frutos dos indivíduos do morfo longistilos, quando comparado aos brevistilos (García-Robledo 2008). De forma semelhante, em estudo com as espécies enantiostílicas monomórficas *Qualea parviflora* e *Q. multiflora* (Vochysiaceae), foram observadas diferenças na correspondência espacial entre as estruturas sexuais (MORAIS, 2020). Neste último caso, os estigmas das flores dessas espécies possuem baixa variação na posição e se mantem afastados do eixo central da flor. Já as anteras estão posicionadas próximo ao centro floral, também afetando o fluxo de pólen. No entanto, não conseguimos saber qual dos morfos é afetado quanto a chegada ineficiente de pólen.

A variação do posicionamento dos estiletos, observada nas flores dos indivíduos das três espécies, reforça a ideia, citada anteriormente, do aumento da área de captura (Almeida et al. 2013) e redução da competição dos estigmas por pólen. No entanto, nas duas espécies de *Senna*, a maior sobreposição dos posicionamentos dos estiletos em flores direitas e esquerdas, avaliadas pelo posicionamento da pétala diferenciada, pode levar ao aumento da competição por pólen. Enquanto isso, em *C. fasciculata*, essa competição deve ser menor, uma vez que possui menor sobreposição dos estigmas entre morfos. Quando analisamos em nível intra-individual, nos parece que a diminuição da competição por pólen é alcançada, uma vez que observamos redução nessa sobreposição, em parte dos indivíduos. Entretanto essas questões devem ser melhor investigadas, por alguns indivíduos apresentarem alta sobreposição.

Até onde sabemos, não existem estudos que avaliaram as variações e a sobreposição no posicionamento de estiletos em flores de diferentes morfos de espécies enantiostílicas. Os resultados observados corroboram a nossa hipótese e indicam o que parece ser um

padrão na proporção de morfos florais em espécies enantiostílicas monomórficas de Cassiinae. Por outro lado, a alta variação e sobreposição dos posicionamentos dos estiletes precisam ser melhor investigadas em suas funcionalidades, podendo ter como significado um maior aproveitamento do pólen no corpo do polinizador. Além disso, existem relatos da funcionalidade central apenas, incluindo o nosso estudo, em cinco espécies enantiostílicas pertencentes a subtribo Cassiinae (*C. flexuosa*, *C. fasciculata*, *S. uniflora*, *S. aversiflora*, *S. rugosa*). Desta forma, são necessárias investigações envolvendo outras espécies do grupo e externas a ele, focados, principalmente na funcionalidade deste terceiro morfo floral e sua interferência no fluxo polínico entre os morfos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA NM, CASTRO CC, LEITE AV, NOVO RR, MACHADO IC. (2013a) Enantiostyly in *Chamaecrista ramosa* (Fabaceae-Caesalpinioideae): floral morphology, pollen transfer dynamics and breeding system. **Plant Biology**. 15: 369-375.
- ALMEIDA, N. M. et al. (2015). Breeding systems of enantiostylous Cassiinae species (Fabaceae, Caesalpinioideae). **Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 215, p. 9–15, ago.
- ALMEIDA, N. M.; DE CASTRO, C. C. (2019). Enantiostyly in Angiosperms. In: **Asymmetry in Plants**. CRC Press,. p. 319-328.
- ALMEIDA, N. M.; SOUZA, J. T.; OLIVEIRA, C. R. S.; BEZERRA, T. T.; NOVO, R. R.; SIQUEIRA FILHO, J. A.; OLIVEIRA, P. E.; CASTRO, C. C. 2018. Functional dimorphic enantiostyly in monomorphic enantiostylous species of the subtribe Cassiinae (Fabaceae- Caesalpinioideae). **Plant Biology**, [S. l.], v. 20, n. 4, p. 797–801.
- AMORIM T, MARAZZI B, SOARES A.A, FORNI-MARTINS ER, MUNIZ CR, WESTERKAMP C. 2017. Ricochet pollination in *Senna* (Fabaceae) - petals deflect pollen jets and promote division of labour among flower structures. **Plant Biology** 19(6): 951-962..
- BARRETT S.C.H. 2002. The evolution of plant sexual diversity. **Nature Reviews Genetics** 3: 274– 284.

BATES D, MAECHLER M, BOLKER B, WALKER S, CHRISTENSEN RHB, SINGMANN H, DAI B, SCHEIPL F, GROTHENDIECK G, GREEN P, FOX J. 2018. *lme4: linear mixed-effects models using Eigen and S4. R package v.1.1–21*. Available at: <https://CRAN.R-project.org/package=lme4>.

BRAGA, B. L. P. Reciprocidade floral e morfo-funcionalidade de estiletos em uma espécie enantiostílica monomórfica do gênero *Senna* Mill. (Fabaceae-Caesalpinioideae). Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Botânica, Recife, 2021.

COELHO, C.P.; BARBOSA, A.A.A. Biologia reprodutiva de *Palicourea macrobotrys* Ruiz & Pavon (Rubiaceae): um possível caso de homostilia no gênero *Palicourea* Aubl. **Revista Brasileira de Botânica** 26:403-413. 2003.

CONSOLARO, H. et al. Distilia e homostilia em espécies de *Palicourea* Aubl.(Rubiaceae) do Cerrado do Brasil Central. **Brazilian Journal of Botany**, v. 32, p. 677-689, 2009.

DE-PAULA, O. C; OLIVEIRA, D. M. T. 2007. Variação da estrutura carpelar em seis espécies de Cassiinae (Leguminosae: Caesalpinioideae). **Acta botanica brasílica**, v. 21, n. 4, p. 915-925.

ENDELS, P., JACQUEMYN, H., BRYS, R. & HERMY, M. Changes in pin-thrum ratios in populations of heterostyled *Primula vulgaris* Huds: Does imbalance affect populations persistence ? **Flora**, 197:326-331. 2002.

FENSTER, Charles B. Flores espelhadas e seu efeito na taxa de cruzamento em *Chamaecrista fasciculata* (Leguminosae). **American Journal of Botany** , v. 82, n. 1, pág. 46-50, 1995.

FENSTER, Charles B. Fluxo gênico em *Chamaecrista fasciculata* (Leguminosae) II. Estabelecimento de genes. **Evolução** , v. 45, n. 2, pág. 410-422, 1991.

FOX J, WEISBERG S. 2018. *car: an {R} companion to applied regression, 3rd edn. R package v.3.0-3*. Thousand Oaks: Sage. Available at: <https://CRAN.R-project.org/package=car>.

GARCÍA-ROBLEDO, C. Asymmetry in pollen flow promotes gender specialization in morphs of the distylous neotropical herb *Arcytophyllum lamarum* (Rubiaceae). **Evolutionary Ecology**, 22: 743-755. 2008.

- HAMILTON, C.W. 1990. Variation on a distylous Theme in Mesoamerican Psychotria subgenus Psychotria (Rubiaceae). *Mem. New York Bot. Gdn.* 55:62-75.
- JESSON, L. K, BARRETT, S.C.H. 2002. Enantiostyly in Wachendorfia (Haemodoraceae): The influence of reproductive systems on the Maintenance of the polymorphism. *American Journal of Botany* 89(2): 253–262.
- LAU, P; BOSQUE, C. Fluxo de pólen no distilo Palicourea fendleri (Rubiaceae): um teste experimental da hipótese do fluxo de pólen desassortativo. *Oecologia* , v. 135, n. 4, pág. 593-600, 2003.
- LENTH R, SINGMAN H, LOVE J, BUERKNER P, HERVE M. 2019. *emmeans: estimated marginal means, aka least-squares means. R package v.1.4.* Available at: <https://CRAN.R-project.org/package=emmeans>.
- MORAIS, J. M. et al. 2020. Patterns of pollen flow in monomorphic enantiostylous species: the importance of floral morphology and pollinators' size. *Plant Systematics and Evolution*, v. 306, n. 2, p. 1-12.
- R CORE TEAM. 2019. *R: a language and environment for statistical computing.* Vienna: R Foundation for Statistical Computing. Available at: <https://www.r-project.org/>.
- STUDER, A.; NUSBAUMER, L.; SPICHIGER. R. 2015. Biodiversidade da Reserva Biológica de Pedra Talhada. *Genève*, 1-818.
- TANG, L. L., & HUANG, S. Q. (2005). Variation in daily floral display and the potential for geitonogamous pollination in two monomorphic enantiostylous Monochoria species. *Plant Systematics and Evolution*, 253(1), 201-207.
- WESTERKAMP, C. 2004. Ricochet pollination in Cassias—and how bees explain enantiostyly. Solitary bees: conservation, rearing and management for pollination. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, p. 225–230.

ANEXOS



Figura 1: *Senna aversiflora* (A); *Senna uniflora* (B); *Chamaecrista fasciculata* (C).

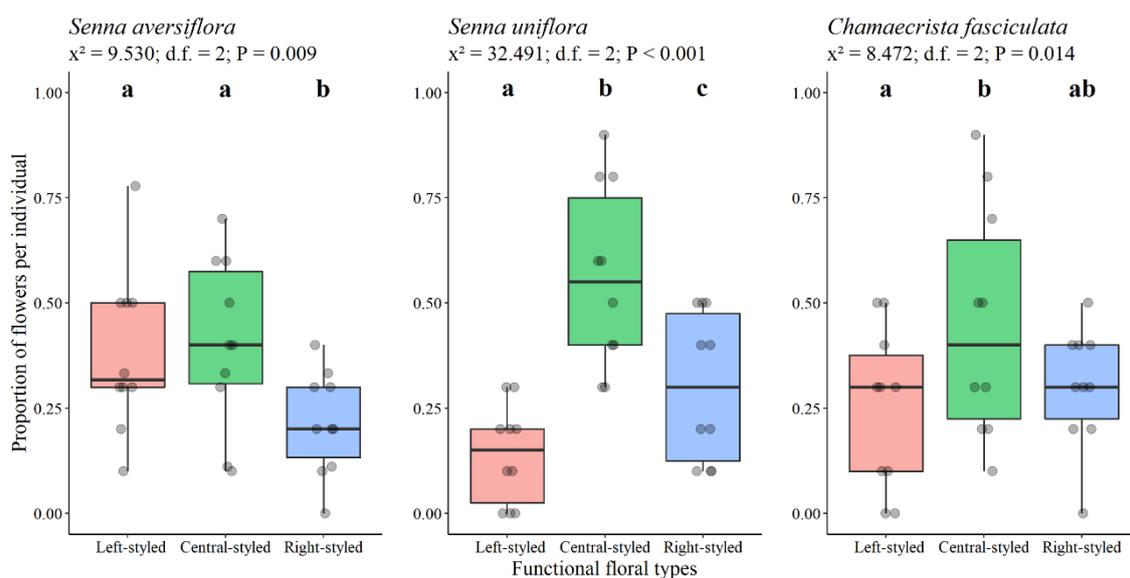


Figura 2. Boxplots da proporção de tipos florais funcionais em indivíduos das três espécies estudadas. Os pontos cinza mostram os dados observados em cada indivíduo. Os valores estatísticos gerais são indicados no canto superior esquerdo de cada plot. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p < 0,05$) em testes post hoc.

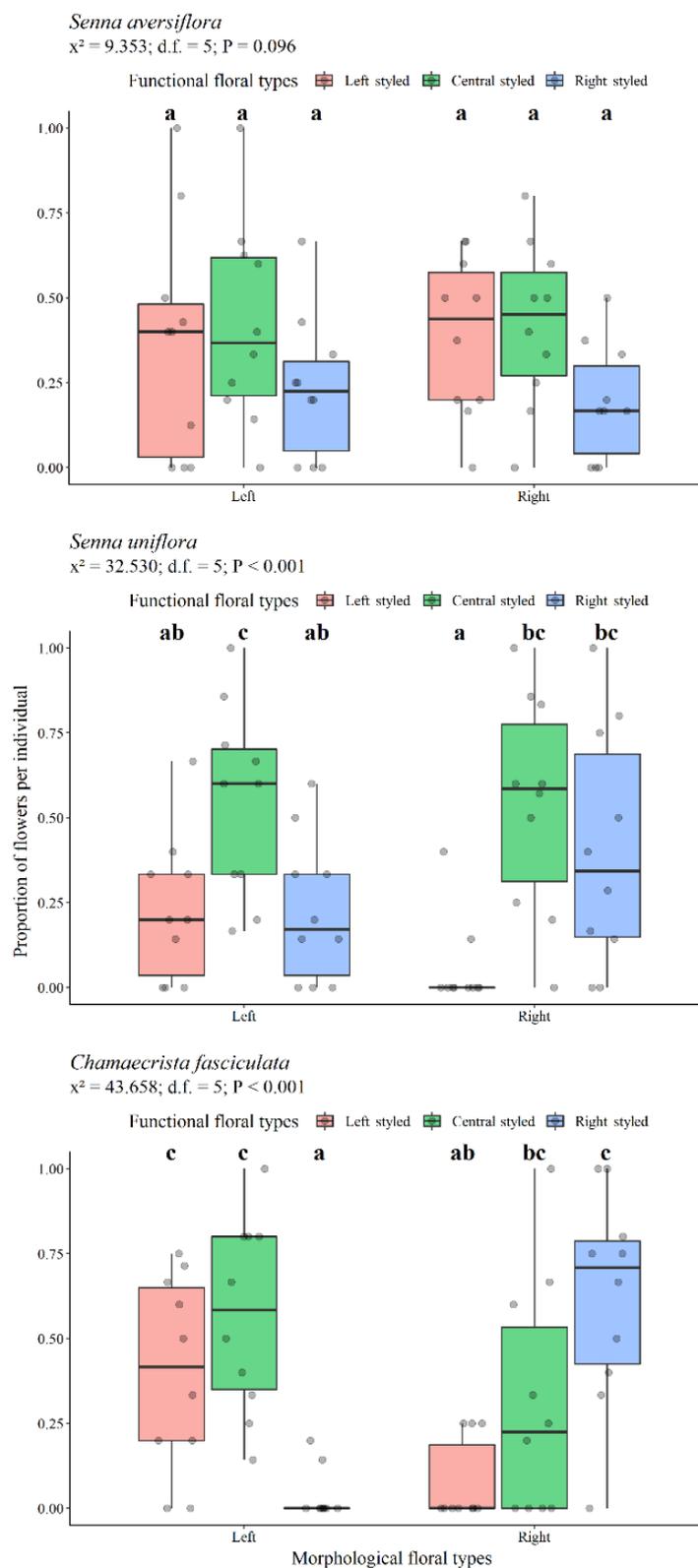


Figura 3. Boxplots da proporção de tipos florais funcionais de acordo com o tipo morfológico em indivíduos das três espécies estudadas. Os pontos cinza mostram os dados observados em cada indivíduo. Os valores estatísticos gerais são indicados no canto

superior esquerdo de cada plot. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p < 0,05$) em testes post hoc.

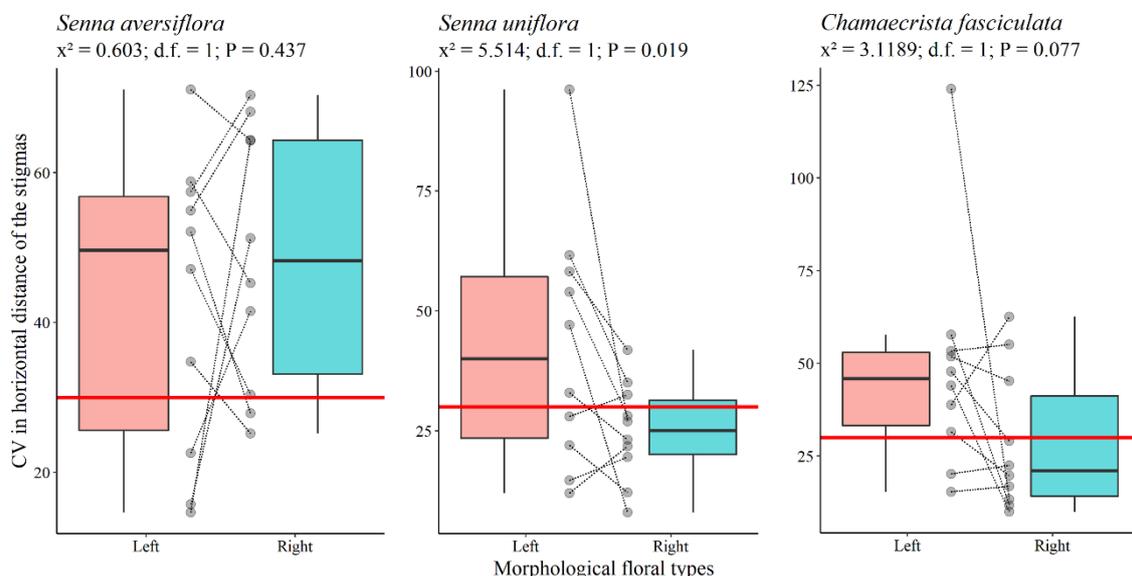


Figura 4. Boxplots do coeficiente de variação (CV) intra-individual na medida da distância horizontal dos estigmas nas flores esquerda e direita, com base no critério morfológico, das três espécies estudadas. Os pontos cinza mostram o CV observado nas flores esquerda ou direita de cada indivíduo. Pontos acima da linha vermelha indicam alta variação ($> 30\%$). As linhas conectam os dados observados dentro do mesmo indivíduo. Os valores estatísticos para comparações entre os tipos florais são indicados no canto superior esquerdo de cada plot.

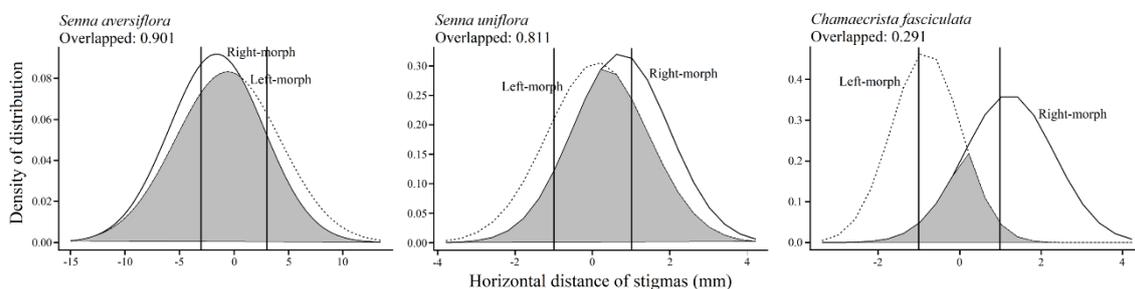


Figura 5. Distribuição espacial e sobreposição na distância horizontal dos estigmas entre flores morfológicamente à esquerda (linhas pontilhadas) e à direita (linhas contínuas) das três espécies estudadas. A área cinza indica a proporção de sobreposição entre as flores esquerda e direita. O valor da proporção de sobreposição é apresentado na parte superior

esquerda de cada plot. O intervalo entre as duas linhas verticais centrais indica a posição funcionalmente central do estigma.

INFORMAÇÕES DE APOIO

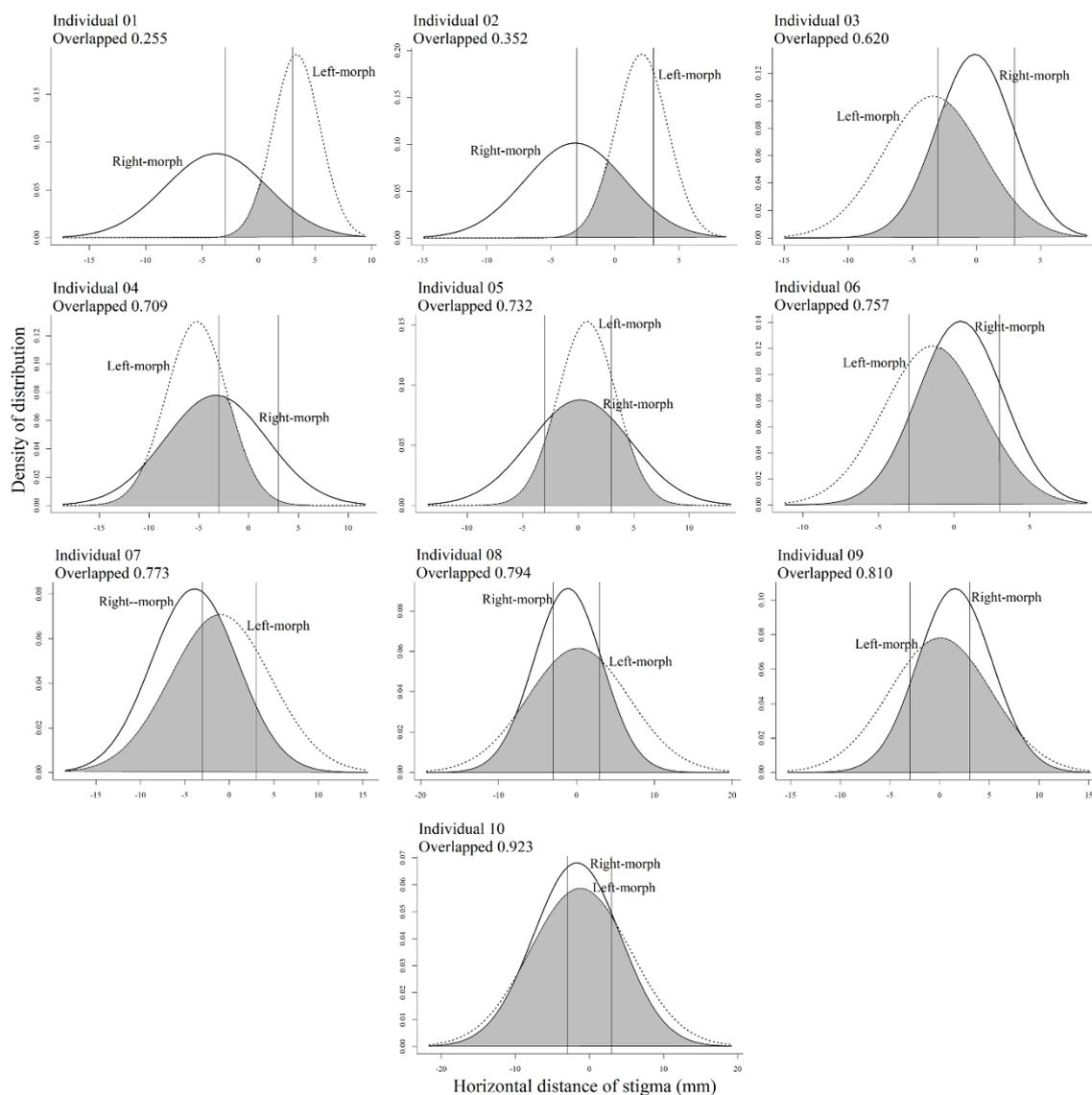


Figura S2. Distribuição espacial e sobreposição intra-individual na distância horizontal dos estigmas entre flores morfológicamente à esquerda (linhas pontilhadas) e à direita (linhas contínuas) nos 10 indivíduos estudados de *Senna aversiflora*. A área cinza indica a proporção de sobreposição entre as flores esquerda e direita. O valor da proporção de sobreposição de cada indivíduo é apresentado na parte superior esquerda de cada plot. O

intervalo entre as duas linhas verticais centrais indica a posição funcionalmente central do estigma. Os plots foram ordenados de acordo com o nível de sobreposição de cada indivíduo.

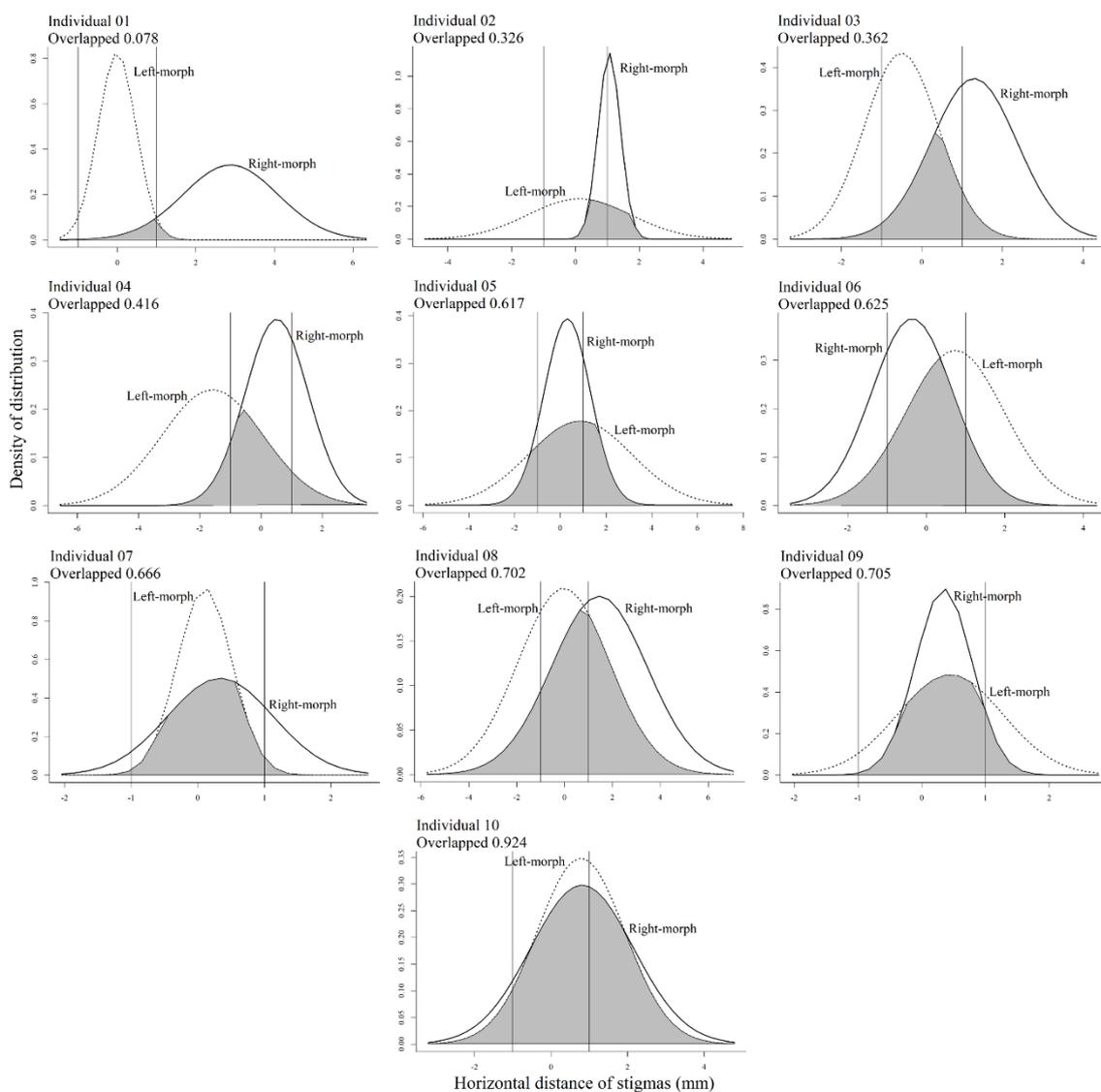


Figura S3. Distribuição espacial e sobreposição intra-individual na distância horizontal dos estigmas entre flores morfologicamente à esquerda (linhas pontilhadas) e à direita (linhas contínuas) nos 10 indivíduos estudados de *Senna uniflora*. A área cinza indica a proporção de sobreposição entre as flores esquerda e direita. O valor da proporção de sobreposição de cada indivíduo é apresentado na parte superior esquerda de cada plot. O intervalo entre as duas linhas verticais centrais indica a posição funcionalmente central do estigma. Os plots foram ordenados de acordo com o nível de sobreposição de cada indivíduo.

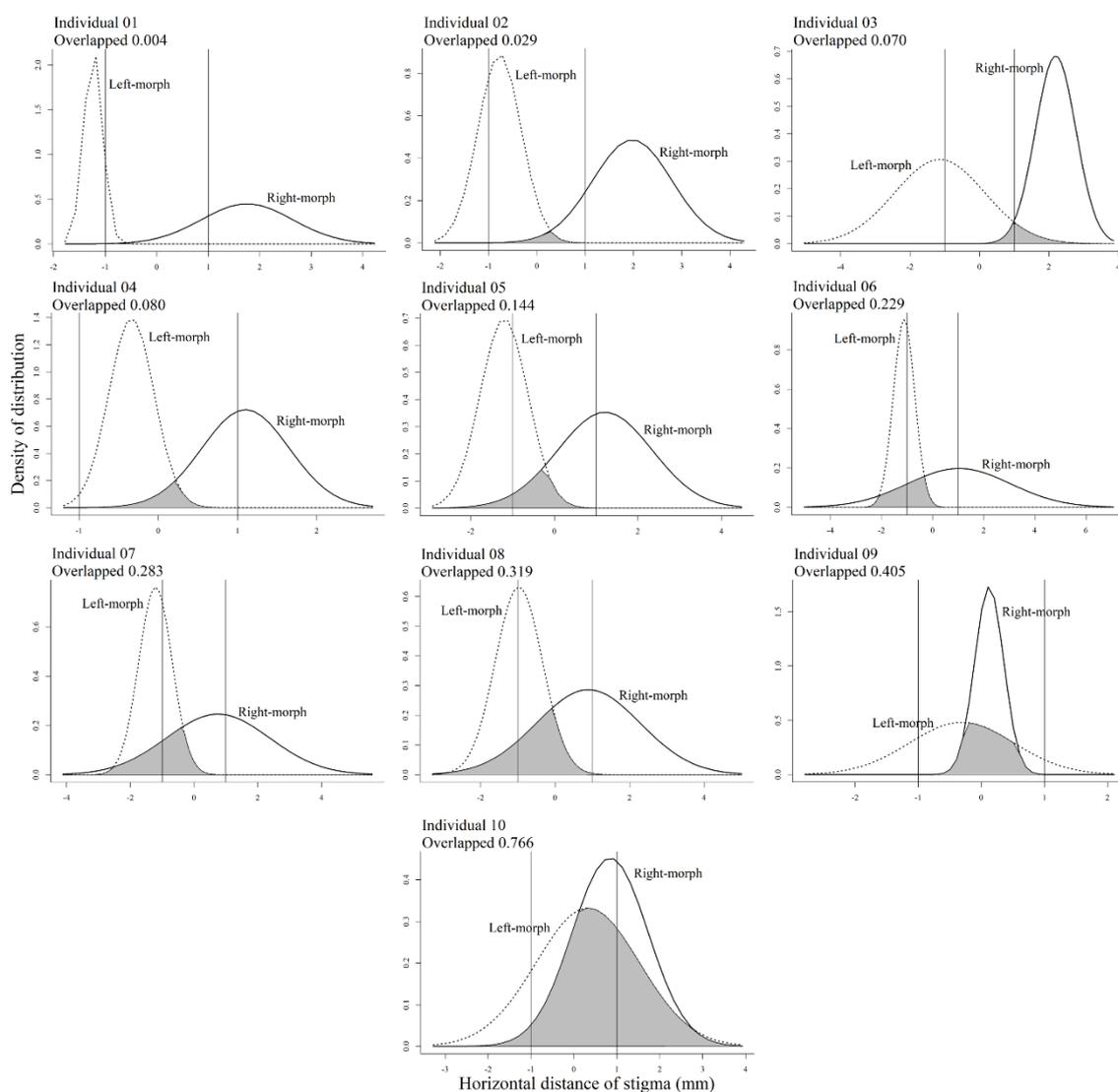


Figura S4. Distribuição espacial e sobreposição intra-individual na distância horizontal dos estigmas entre flores morfologicamente à esquerda (linhas pontilhadas) e à direita (linhas contínuas) nos 10 indivíduos estudados de *Chamaecrista fasciculata*. A área cinza indica a proporção de sobreposição entre as flores esquerda e direita. O valor da proporção de sobreposição de cada indivíduo é apresentado na parte superior esquerda de cada plot. O intervalo entre as duas linhas verticais centrais indica a posição funcionalmente central do estigma. Os plots foram ordenados de acordo com o nível de sobreposição de cada indivíduo.

CAPÍTULO 2:

**Morfologia funcional de estiletos e eficiência na coleta de pólen em *Senna
aversiflora* (Herb.) H. S. Irwin & Barneby (Leguminosae)**

Manuscrito a ser submetido ao periódico *Plant Biology*

Fator de Impacto 3.081

Normas para submissão:

<https://onlinelibrary.wiley.com/page/journal/14388677/homepage/forauthors.html>

**Morfologia funcional de estiletos e eficiência na coleta de pólen em *Senna
aversiflora* (Herb.) H. S. Irwin & Barneby (Leguminosae)**

José Ronaldo Ferreira de Lima¹; Larissa Chagas Oliveira²; Vinicius L. G. Brito^{2,3};
Cibele Cardoso de Castro^{1,4}; Natan Messias Almeida^{1,5}

¹Programa de Pós-graduação em Biodiversidade. Universidade Federal Rural do Pernambuco. Av. Dom Manuel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE, Brasil, 52171900.

²Programa de Pós-graduação Em Biologia Vegetal, Universidade Federal de Uberlândia, Campus Umuarama, Uberlândia, MG 38400-902.

³Universidade Federal de Uberlândia, Av. João Naves de Ávila, 2121 - Santa Mônica, Uberlândia - MG, 38408-100

⁴Universidade Federal do Agreste de Pernambuco, Av. Bom Pastor, s/n - Boa Vista, Garanhuns - PE, 55292-270

⁵Universidade Estadual de Alagoas, Campus III, Rodovia AL 105, s/n, Graciliano Ramos, Palmeira dos Índios, Brasil, 57600005

*Autor de correspondência: J. R. F. Lima (ronaldolima1997@gmail.com)

RESUMO

A evolução dos traços florais, especialmente características morfológicas, que influenciam a remoção e deposição de pólen, tem sido interpretada como adaptações que potencializam e facilitam o cruzamento entre as flores mediado pela atuação de animais. Alguns estudos trazem a avaliação da aptidão feminina, principalmente relacionadas a morfologia dos aspectos florais reprodutivos. Desta forma nosso estudo teve como objetivo investigar a influência da variação morfológica dos estiletos e estigmas na captura de pólen nos corpos dos polinizadores, norteando-se pelas seguintes perguntas: P1) Como a forma do gineceu e a área da superfície estigmática influenciam na quantidade de pólen capturado e amplitude da captura?; P2) Como diferentes formas de gineceu e estigmas influenciam na ocorrência da autopolinização?. Para isso foram realizados testes de autopolinização e eficiência da coleta de pólen em *Senna aversiflora*, verificando a forma através de pontos homólogos e posteriormente realizando a análise de seleção fenotípica. Os nossos resultados indicaram que a forma não influencia na densidade de pólen encontrada nos estigmas de *S. aversiflora*, no entanto a amplitude de movimento do estilete, no teste de eficiência, apresentou uma seleção direcional com amplitudes menores apresentando maiores densidade de pólen. Diante disso é possível definir que, embora a forma aparentemente não influencie na aptidão reprodutiva, o espaço da amplitude do movimento gerado pela a vibração da abelha pode interferir.

INTRODUÇÃO

A enantiostilia é um polimorfismo floral, no qual indivíduos da mesma espécie apresentam duas formas florais que diferem no posicionamento do estilete em relação ao centro floral (BARRETT, 2002; JESSON & BARRETT, 2002). As estruturas geralmente apresentam-se de forma recíproca nos dois morfos florais, sendo descritos como direito, com estilete disposto à direita e as anteras à esquerda, e esquerdo, com estilete voltado à esquerda e as anteras à direita do eixo central. Devido a esse posicionamento das estruturas reprodutivas, as flores formam imagens especulares umas das outras, sendo necessária a ocorrência do fluxo de pólen entre os morfos direito e esquerdo para a polinização ser efetiva, uma vez que o mecanismo da enantiostilia reduz naturalmente a ocorrência da autopolinização (JESSON & BARRETT, 2002; ALMEIDA, 2013b).

A evolução dos traços florais, especialmente características morfológicas, que influenciam a remoção e deposição de pólen, tem sido interpretada como adaptações que potencializam e facilitam o cruzamento entre as flores mediado pela atuação de animais (HERRERA, 1996; PROCTOR, 1996; FENSTER et al., 2004). As estruturas reprodutivas das flores com suas mais variadas morfologias estão estritamente ligadas ao sucesso reprodutivo, isso por que muitas espécies possuem um grande nível de especialização, necessitando de polinizadores específicos para efetivar a polinização (ALMEIDA, 2012; SUTHERLAND, 1984). Desta forma, é importante entendermos o processo acerca da produção, doação de pólen (aptidão masculina) e a produção de sementes (aptidão feminina; SUTHERLAND, 1984; BAKER, 2000).

Alguns estudos trazem a avaliação da aptidão feminina, principalmente relacionadas a morfologia do estigma, onde, normalmente, o conjunto de sementes depende da interação bem-sucedida entre pólen e estigma, com o número de grãos coletados podendo depender do tamanho da área estigmática (FURTADO et al. 2021), sendo este um dos processos mais importantes nas Angiospermas (HESLOP-HARRISON 2000; MARAZZI, 2007). DULBERGER et al. (1994), MARAZZI (2007) e ARCEO-GÓMEZ et al. (2011) avaliaram espécies do gênero *Cassia*, *Senna* e *Chamaecrista*, e verificaram que o acesso à superfície estigmática é protegido por uma franja de tricomas tendo o tamanho e o número variando de acordo com as espécies. Sigrist & Sazima (2004) e Arceo-gómez et al. (2011) constataram que essa cobertura é removida mecanicamente pela vibração gerada pelos polinizadores durante a visita, aumentando o contato do pólen com estigma tendo maior efetividade reprodutiva.

A subtribo Cassiinae (Fabaceae) apresenta características morfológicas florais específicas compartilhadas entre seus gêneros *Senna*, *Cassia* e *Chamaecrista* (ALMEIDA et al. 2015). Espécies desses gêneros apresentam variações morfométricas florais, como tamanho e curvatura dos estiletos, área da superfície estigmática e diâmetro da corola (GOTTSBERGER; SILBERBAUER-GOTTSBERGER, 1988). As flores do gênero *Senna* representam bem essas variações morfológicas, com seus representantes caracterizando-se por apresentar espécies enantiostílicas monomórficas, possuindo dois morfos florais (direito e esquerdo) em um mesmo indivíduo, possibilitando a ocorrência da geitonogamia (JESSON et al. 2003). Além da ocorrência de dois morfos florais, característicos da enantiostilia (ALMEIDA et al. 2015), flores de *Senna* apresentam variações morfológicas (dimensões das estruturas) entre espécies, na espécie e até mesmo no indivíduo (SANTOS et al., 2020). Outra característica das flores de *Senna* é a oferta de pólen como único recurso, sendo conhecidas como “flores de pólen”, necessitando de polinizadores especializados que possuem capacidade de vibração para liberar o pólen contido nos seus estames, caracterizando a “buzz-pollination” ou polinização por vibração (BUCHMANN, 1974).

A partir do entendimento dessas variações é importante, em meio a lacunas existentes, a realização de estudos acerca de mecanismos que possam influenciar no sucesso reprodutivo de espécies de *Senna*, principalmente pela ocorrência da enantiostilia e dependência deste polimorfismo de uma dinâmica eficiente de deposição e captação de pólen. Assim, o objetivo desse estudo foi investigar a influência da variação morfológica dos estiletos e estigmas na captação de pólen nos corpos dos polinizadores. Para atingi-lo, buscamos responder as seguintes perguntas e testar as respectivas hipóteses: P1) Como a forma do gineceu e a área da superfície estigmática influenciam na quantidade de pólen capturado e amplitude da captação?; H1) Formas intermediárias de gineceu capturam maior quantidade de grãos de pólen e apresentam maior amplitude de captação.; P2) Como diferentes formas de gineceu e estigmas influenciam na ocorrência da autopolinização?; H2) Formas de gineceu maiores e mais curvadas, apresentam maior número de grãos de pólen, oriundos da autopolinização, em seus estigmas.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

O estudo foi realizado na Reserva Biológica de Pedra Talhada, um remanescente de Mata Atlântica (450 e 900 m de altitude) localizado entre os estados de Pernambuco e Alagoas, nordeste do Brasil. Inserida entre as longitudes oeste de 36°22' à 36°28' e entre as latitudes sul de 9°11' a 9°16', esta unidade de conservação ocupa uma área de cerca de 4.500 ha abrangendo parte dos municípios de Lagoa do Ouro em Pernambuco, Quebrangulo e Chã Preta em Alagoas (STUDER et al., 2015).

Espécie estudada

A *Senna aversiflora* é uma espécie endêmica do Brasil, possuindo registro apenas na Região Nordeste (AL, BA, PB e PE), no domínio da Caatinga (SANTOS, 2020). Caracteriza-se por ser mais frequente em bancos de rios sobre solos arenosos, em altitudes de 300 a 700 m. Suas inflorescências bifloras, com as duas flores surgindo do mesmo ponto no ápice do pedúnculo sendo zigomorfas, amarelas com cinco pétalas. Possui hábito arbustivo variando de 1,8 a 4,0 m de altura, com floração observada nos meses de setembro e outubro (SANTOS, 2020; QUEIROZ, 2018). Observações anteriores mostram que a espécie apresenta enantiostilia monomórfica.

Frequência e comportamento dos visitantes florais

Preliminarmente fizemos um levantamento dos visitantes florais através de observações focais, com auxílio de câmeras fotográficas, durante 16 dias, gerando um esforço amostral aproximado de 100hrs, durante todo o período de antese das flores, em 10 indivíduos de duas populações de *Senna aversiflora*. Durante as observações foram registradas as espécies de visitantes florais, a frequência de visitas, comportamento na flor e resultado da visita (polinizador, quando este entra em contato com anteras e estigma ou como pilhador, quando não ocorre o contato). Ao realizar as visitas nas flores, com auxílio de uma rede entomológica, para auxiliar na identificação, algumas abelhas foram capturadas.

Sistema de acasalamento

Foram realizados testes de polinização controlada em flores de inflorescências isoladas com sacos de tecido “voil”, ainda em fase de botões florais. As flores foram

submetidas ao tratamento de autopolinização manual, com cinco flores de seis indivíduos (n=30), em antese, recebendo pólen de uma antera da própria flor, avaliando, posteriormente, o percentual de frutos formados.

Eficiência da coleta de pólen

Foram coletadas em campo e fotografadas em laboratório 10 flores isoladas, ainda em fase de botões, de 10 indivíduos (n=100), não recebendo visitas de polinizadores. com as fotografias sendo retiradas de uma distância e posicionamento padronizados, para a mensuração da forma do gineceu, através da morfologia geométrica, tendo o auxílio das versões tpsUtil para organizar, ordenar e manipular as listas de imagens geradas e o tpsDig para digitalizar os marcos anatômicos nas imagens para delimitar as imagens e obter a forma do gineceu, sendo definidos 4 pontos homólogos delimitados entre a base do gineceu, início do ovário, ligação do ovário com o estilete e o ápice do estigma (Fig. 1). A área do estigma foi obtida a partir de fotografias, com auxílio de uma lupa eletrônica, e posterior medição através do software ImageJ (disponível em <http://imagej.nih.gov/ij/>). As flores foram coletadas no mesmo dia ou em dias distintos, a depender da disponibilidade de flores dos indivíduos. No momento da coleta, foram retiradas suas pétalas e estames para evitar a liberação de pólen nos estigmas durante o transporte.

As simulações de visitas às flores, em laboratório, foram realizadas a partir do uso de uma estrutura regulável, na qual foi fixado o pedúnculo da flor contendo apenas o gineceu, e em uma outra, ao lado, foi fixado retângulos de papel camurça, com dimensões de 1cm x 3cm, onde foi depositado uniformemente o pólen de 3 anteras em sua superfície, com o auxílio de um pincel de cerdas macias. Para simular a vibração no momento da visita, característica em espécies que visitam flores de pólen, nos baseamos no método aperfeiçoado por Amorim et al. (2017). Utilizamos escovas de dentes elétricas (sonicador) com frequências que representam a faixa de vibração nas visitas de algumas abelhas (172,7-324,1Hz) (BURKART et al. 2011). O gineceu foi posicionado com o estigma direcionado ao centro da superfície retangular contendo pólen para ser vibrado. Após a vibração (definida a partir de observações prévias feitas em campo), o pólen foi coletado do estigma, através de raspagem com auxílio de um bisturi, com posterior montagem de lâminas (com solução de carmin acético) com o conteúdo polínico dos estigmas. A contagem do número de grãos foi feita através de um microscópio óptico.

Para avaliação da amplitude (deslocamento no momento da vibração) da área de captação de pólen pelos estigmas, foram feitas filmagens, com distância e posicionamento

padronizados, da superfície retangular (1 cm X 3 cm) de papel camurça com o estigma posicionado no centro. Posteriormente, com o auxílio do software ImageJ, foi medido o deslocamento do estigma na superfície retangular, através da análise quadro a quadro da filmagem, sendo utilizado o software Free Video to JPG Converter, para converter os vídeos em frames para a avaliação do deslocamento do estigma.

Ocorrência da autopolinização

Para esta avaliação, foram coletadas em campo e fotografadas em laboratório, 10 flores não visitadas de 10 indivíduos (n=100).

Após essa etapa foram realizadas simulações de visitas de polinizadores, onde as flores, com todas as estruturas, foram fixadas em uma haste de metal através do pedúnculo. As abelhas simuladas, produzidas a partir de papel camurça, apresentam dimensões semelhantes às abelhas naturais. As vibrações foram geradas a partir de escovas de dentes elétricas (sonicador), com frequências que representam a faixa de vibração nas visitas de algumas abelhas (172,7-324,1Hz) (BURKART et al. 2011; AMORIM et al. 2017). O sonicador foi acionado durante o mesmo tempo do visitante mais frequente de *Senna aversiflora*.

Como pretendíamos avaliar o número de grãos de pólen oriundos da autopolinização, as abelhas simuladas não continham grãos de pólen em seus corpos, evitando a contaminação por pólen de outras flores utilizadas anteriormente. Para realizar a limpeza das abelhas entre as simulações foi utilizado um pincel com cerdas macias, retirando o pólen remanescente do teste anterior. Após as simulações, o pólen foi coletado do estigma e avaliada a forma do gineceu e área do estigma, seguindo os métodos citados no primeiro tópico.

Análise estatística

As variáveis de forma foram geradas no programa R (pacote geomorf) através de uma Análise Generalizada de Procrustes (GPA) que remove efeitos de posição e orientação através do método de quadrados mínimos (Adams et al., 2004). A forma da estrutura pode ser representada por um ponto no espaço de forma não-Euclidiano gerado pela GPA. Valores de deformações relativas (RW) foram obtidos através da interpolação das coordenadas das estruturas e usados como medidas de variação na forma da estrutura em cada indivíduo. O tamanho do centroide ($\sqrt{\sum d^2 \cdot x_i \cdot G}$) foi usado como uma medida adimensional do tamanho dessas estruturas (Bookstein, 1991; Klingenberg, 2004, 2016).

Nesta fórmula, $d^2 \cdot x_i \cdot G$ é a distância do marco anatômico i ao centroide dos pontos. A distribuição de todas essas métricas foi analisada graficamente.

Seleção fenotípica

Testamos a correlação entre as variáveis tamanho e forma (RW1 e RW2) do pistilo, em suas vistas laterais e frontais, e amplitude, no teste de eficiência, e entre tamanho e forma do pistilo, em suas vistas laterais e frontais, no teste de autopolinização usando a correlação de Spearman. As variáveis que não apresentaram correlação entre si foram selecionadas para a análise de seleção fenotípica (ver abaixo em resultados). No teste de eficiência estas se referem à tamanho e forma (RW1 e RW2) vista lateral e amplitude, e no teste de autopolinização referem-se à tamanho e forma (RW1).

Para estimar a seleção fenotípica nestes atributos, através da densidade de pólen no estigma, avaliamos os gradientes de seleção padronizados (β) usando modelos mistos lineares considerando a densidade de pólen depositada no estigma (calculada como aptidão individual/aptidão média da população, w) como variável resposta, e valores padronizados de tamanho, forma (RW1 e RW2) e amplitude (teste eficiência) e tamanho e forma (RW1) (teste autopolinização) (com média 0 e uma variância de 1) como variáveis explicativas.

Também calculamos gradientes de seleção não linear (γ) para estimar a seleção estabilizadora/disruptiva obtendo desvios quadráticos da média para valores simples e quadráticos de tamanho e forma do estilete e amplitude, considerando o teste de eficiência e de tamanho e forma (RW1), considerando o teste de autopolinização. Os coeficientes de regressão quadrática foram duplicados para estimar gradientes de seleção estabilizadora/disruptiva adequadamente.

A seleção correlacional entre os atributos florais (tamanho \times forma RW1 \times forma RW2 \times amplitude – teste eficiência; tamanho \times forma RW1 – teste autopolinização) também foi estimada. Todos os modelos foram realizados usando o software R.

RESULTADOS

Autocompatibilidade e visitantes florais

Senna aversiflora mostrou-se autocompatível, formando todos os frutos oriundos de flores utilizadas no tratamento de autopolinização manual.

No total, oito espécies visitaram as flores de *Senna aversiflora*, das quais predominaram espécies do gênero *Xylocopa* (*X. cearensis*, *X. frontalis* e *X. nigrita*). No

entanto, as espécies *Bombus* sp., *Augochlora* sp., *Eulaema bombiformis* e *Centris* sp. também visitaram as flores. *Xylocopa cearensis* com 2773 (79,78%) visitas, foi a mais frequente, por isso foi utilizada como modelo nas simulações de visitas.

Formas dos pistilos, Eficiência e amplitude da coleta de pólen e autopolinização

Em relação as formas dos pistilos os valores máximos e mínimos dos componentes de deformação parcial (RW1 e RW2) descreveram padrões semelhantes da forma do pistilo nos testes (fig.2 e 3). No teste de eficiência vista frontal os valores de RW1 e RW2 descrevem curvatura do pistilo e a proximidade do estigma ao ovário. Enquanto valores maiores de RW1 e RW2 estão relacionados com formas mais curvadas e estigmas mais próximos ao ovário, valores menores estão relacionados com formas menos curvas e estigmas mais distantes do ovário. Ainda no mesmo teste, vista lateral os valores de RW1 e RW2 descrevem o mesmo padrão, porém com resultados opostos entre valores máximos e mínimos de RW2. Enquanto valores maiores e menores de RW1 estão relacionados com formas mais curvadas e próximas ao ovário e menos curvas e mais distantes do ovário respectivamente, valores maiores de RW2 se relacionam com formas menos curvadas e mais distantes do ovário e valores menores se relacionam com formas mais curvadas e próximas ao ovário (fig. 2 e 3). No teste de autopolinização, em ambas as vistas, os valores de RW 1 e RW2 também parecem descrever a curvatura do pistilo e o posicionamento do estigma ao ovário. Valores maiores de RW1 e RW2 apresentam formas mais curvadas e estigmas mais próximos ao ovário e valores menores apresentam pouca curvatura e estigmas mais distantes do ovário.

Em ambos os testes, autopolinização e eficiência, as variáveis de vista frontal (tamanho e forma RW1 e RW2) apresentaram correlação com as variáveis de vista lateral (tamanho e forma RW1 e RW2) e amplitude do estilete (Tabela 1 e 2).

A amplitude do deslocamento do estilete durante a simulação (vibração) variou de 0.214 mm a 4.940 mm. O número de grãos de pólen coletados pelos estigmas variou de 6 a 139 grãos. Já a área do estigma variou em mm².

Seleção fenotípica

As estimativas de seleção fenotípica não apresentaram valores significativos para os atributos analisados no teste de autopolinização, no entanto, no teste de eficiência, estas estimativas apontaram seleção na amplitude do estilete (Tabela 3). A variável apresentou valores significativos de seleção direcional negativa através do sucesso

relativo indicando uma densidade maior de pólen depositada no estigma com a redução da amplitude do estilete ($\beta_i = -0.3451744$, $p < 0.05$).

DISCUSSÃO

Nesse estudo, investigamos a influência da forma do pistilo na eficiência da coleta de pólen em *Senna aversiflora*, buscando entender quais aspectos da forma do pistilo podem impactar na aptidão da espécie. A espécie é autocompatível e apresentou *Xylocopa cearensis* como principal polinizador, a qual foi utilizada como modelo para as simulações das visitas. Os pistilos variaram em suas formas em relação à curvatura do estilete e proximidade do estigma com o ovário, tanto na avaliação da vista frontal como da lateral. Nossas hipóteses de influência das formas dos pistilos não foram corroboradas, uma vez que o potencial de ocorrência da autopolinização e a eficiência na captura dos grãos de pólen não se mostraram dependentes das formas dos pistilos. No entanto, uma menor amplitude de deslocamento do estilete mostrou maior eficiência no número de grãos de pólen coletados. Em seguida, discutiremos os nossos principais achados e implicações para a biologia reprodutiva de *Senna aversiflora*.

A variação nas formas dos pistilos pode resultar em diferentes funções adaptativas nas populações, como ocorre, por exemplo, com *Brassica napus* (CRESSWELL, 2000). Nessa espécie, o tamanho de seu pistilo influencia diretamente na quantidade de pólen recebida pelos estigmas, o que altera a sua aptidão reprodutiva. *Macairea radula*, uma Melatomataceae, apresenta diferentes formas e posicionamentos das suas anteras e estiletos (OLIVEIRA et al. 2022). Segundo os autores, essas diferenças proporcionam diferentes aptidões reprodutivas a depender de qual visitante floral está interagindo com as flores. Entendemos que, no mesmo sentido, as variações de formas encontradas nos pistilos de *S. aversiflora* são o resultado da interação com diferentes abelhas polinizadoras, uma vez que, apenas em nosso estudo, observamos oito espécies de abelhas visitantes, com diferentes tamanhos corporais e comportamentos de visita, interagindo com as flores de *S. aversiflora*.

Considerando que a aptidão reprodutiva pode aumentar com o número de grãos de pólen recebidos pelos estigmas de uma planta, seja porque o conjunto de sementes pode ser limitado pelo pólen (BIERZYCHUDEK, 1981), ou porque o aumento da densidade de pólen no estigma facilita a germinação do pólen (NIESENBAUM 1999), ou porque a intensa competição de pólen melhora o vigor das progênes (RICHARDSON &

STEPHENSON 1992), o aumento do número de grãos de pólen capturados pelos estigmas de estiletos com menor amplitude nas flores de *S. aversiflora*, confere aumento na aptidão reprodutiva da espécie. Apesar de não identificarmos as características morfológicas que levam os estiletos a apresentarem diferenças nas amplitudes de coleta, a observação de influência desta função no número de grãos capturados pelos estigmas é muito importante para o entendimento do efeito das variações nas estruturas florais na reprodução de plantas, principalmente em espécies de *Senna*, as quais são indicadas como flores muito variantes por diversos autores (MARAZZI; ENDRESS, 2008; ALMEIDA et al. 2015a; ALMEIDA et al. 2015b; AMORIM et al. 2017; ALMEIDA; CASTRO, 2019).

A seleção direcional apontada para maiores densidades de pólen em pistilos de menor amplitude no teste de eficiência, é bastante curiosa. Uma vez que, estigmas que percorrem uma maior área do corpo do polinizador, em teoria, deveriam capturar maior número de grãos de pólen. Visualizamos duas possíveis explicações para este resultado: 1) a compatibilidade dos pistilos com a morfologia do corpo do polinizador utilizado nas simulações (*Xylocopa cearensis*) pode levar a atingirem áreas que recebem maior deposição de pólen, nesta abelha em particular; 2) pistilos com menor movimentação realizam o contato com o corpo do polinizador em uma área menor, reduzindo as perdas de pólen pelo atrito em outras áreas. Para melhor elucidação deste resultado serão necessários simulações envolvendo outras espécies visitantes de *Senna aversiflora*.

No ambiente natural, embora ocasionalmente ocorra a deposição de auto pólen sobre os estigmas, em espécies de flores de pólen, caso do gênero *Senna*, isto ocorre obrigatoriamente com a ação do polinizador, devido a necessidade de vibração das flores para a liberação dos grãos de pólen (ALMEIDA et al. 2013b; ALMEIDA et al. 2015b). A ocorrência da autopolinização, de forma geral, pode ser contornada com altas taxas no número de visitas de polinizadores, que proporciona uma maior deposição de pólen de origem cruzada, potencializado em espécies enantiostílicas, devido a coleta e deposição de pólen sendo realizadas em lados opostos do corpo do polinizador pelas flores direitas e esquerdas (ARCEO-GÓMEZ et al. 2011; MORA-CARRERA et al. 2019). A forma dos pistilos, comuns em espécies de Cassiinae, curvados e alongados, parece favorecer este tipo de polinização (ALMEIDA et al. 2013a). No entanto, a relação entre a forma do pistilo e a ocorrência da autopolinização ainda necessita de maiores esclarecimentos, principalmente quando consideramos o arranjo das peças florais em relação ao corpo e comportamentos individuais de diferentes espécies de polinizadores (FRANZAN, 2010).

Apesar de não termos observados relações entre as formas de pistilos encontradas com a eficiência da polinização e a ocorrência da autopolinização, nosso estudo traz informações importantes sobre os efeitos das variações das estruturas reprodutivas sobre a aptidão reprodutiva de espécies de plantas com flores. O aumento da densidade de grãos de pólen coletados por estigmas com menor amplitude é um resultado que deve ser considerado e investigado para melhor entendimento. Compreendemos que a utilização de outras espécies de abelhas na simulação e a observação de outras variações nas estruturas florais reprodutivas podem auxiliar em um melhor entendimento das relações entre as formas de pistilo e diferenças na aptidão reprodutiva de *Senna aversiflora*. Contudo, a escolha do visitante mais frequente nos traz o panorama natural dessa interação. Apesar disso, entendemos que a consideração do comportamento da espécie de visitante mais frequente, juntamente com características morfológicas florais nos aproximou do melhor entendimento do sistema floral de *Senna aversiflora*, como propõem Oliveira e colaboradores (2022).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA NM, CASTRO CC, LEITE AV, NOVO RR, MACHADO IC. Enantiostyly in *Chamaecrista ramosa* (Fabaceae-Caesalpinioideae): floral morphology, pollen transfer dynamics and breeding system. **Plant Biology** 15: 369-375. 2013a.

ALMEIDA NM, CASTRO CC, LEITE AV, NOVO RR, MACHADO IC. Floral polymorphism in *Chamaecrista flexuosa* (Fabaceae-Caesalpinioideae): a possible case of atypical enantiostyly? **Annals of Botany** 112: 1117–1123. 2013b.

ALMEIDA, N. M. Comportamento dos visitantes e padrões de deposição e capturação de pólen para estimativa do fitness reprodutivo – In: Leal I. R., MEIADO, M. V., Rabbam, A. R. C., and Siqueira Filho, J.A. (eds.), *Ecologia da Caatinga: Curso de Campo*. 2011. **Grafica Printpex**, pp. 353-366, 2012.

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*, 17(3), 740-745. 2015a.

ALMEIDA, N. M. et al. Breeding systems of enantiostylous Cassiinae species (Fabaceae, Caesalpinioideae). **Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 215, p. 9–15, ago. 2015b.

(2013b). Enantiostyly in *Chamaecrista ramosa* (Fabaceae-Caesalpinioideae): floral morphology, pollen transfer dynamics and breeding system. *Plant Biology*, 15(2), 369-375.

ALMEIDA, Natan Messias; CASTRO, Cibele Cardoso. Enantiostyly in Angiosperms. In: **Asymmetry in Plants**. CRC Press, p. 319-328. 2019.

AMORIM T, MARAZZI B, SOARES A.A, FORNI-MARTINS ER, MUNIZ CR, WESTERKAMP C. Ricochet pollination in *Senna* (Fabaceae) - petals deflect pollen jets and promote division of labour among flower structures. **Plant Biology** 19(6): 951-962. 2017.

ARCEO-GÓMEZ, G. et al. Anther and stigma morphology in mirror-image flowers of *Chamaecrista chamaecristoides* (Fabaceae): implications for buzz pollination. **Plant Biology**, v. 13, n. SUPPL. 1, p. 19–24, jan. 2011.

ARMBRUSTER, W. S et al. The adaptive accuracy of flowers: measurement and microevolutionary patterns. **Annals of Botany**, v. 103, n. 9, p. 1529-1545, 2009.

BAKER, A. M., THOMPSON, J. D. e BARRET, S. C. H. Evolution and maintenance of stigma-height dimorphism in *Narcissus*. II. Fitness comparisons between style morphs. *Heredity*. 514-524. 2000.

BARRETT, S.C.H.. The evolution of plant sexual diversity. **Nature Reviews Genetics**. 3: 274–284, 2002

Bierzychudek, P. Pollinator limitation of plant reproductive effort. *American Naturalist* 117:838–840. 1981.

BUCHMANN, S.L. Buzz pollination of *Cassia quiedondilla* (Leguminosae) by bees of the genera *Centris* and *Melipona*. **Bull S Calif Acad Sci** 73:171–173. 1974.

CARVALHO, D. A.; OLIVEIRA, P. E. Biologia reprodutiva e polinização de *Senna sylvestris* (Vell.) HS Irwin & Barneby (Leguminosae, Caesalpinioideae). **Brazilian Journal of Botany**, v. 26, n. 3, p. 319-328, 2003.

CRESSWELL, James E. Manipulation of female architecture in flowers reveals a narrow optimum for pollen deposition. **Ecology**, v. 81, n. 11, p. 3244-3249, 2000.

FENSTER C.B., ARMBRUSTER WS, WILSON P, DUDASH MR, THOMSON J.D. Pollination Syndromes and Floral Specialization. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**. 35:1, 375-403. 2004.

FERNANDES, J.; CRUZ, K.; LOPES, C. R.. MORFOLOGIA DE *Senna occidentalis* (LEGUMINOSAE): uma espécie medicinal em alta floresta, mato grosso. **Enciclopédia biosfera**, v. 19, n. 39, 2022.

FRANZON, R. C.; CASTRO, C. M.; RASEIRA, M. C. B. Variabilidade genética em populações de pitangueira oriundas de autopolinização e polinização livre, acessada por AFLP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 1, p. 240-250, 2010.

HERRERA C.M. Floral traits and plant adaptation to insect pollinators: a devil's advocate approach. In: Lloyd D.G., Barrett S.C.H. (Eds), *Floral biology: studies on floral evolution in animalpollinated plants*. Chapman & Hall, New York, USA: pp 65–87. 1996.

HESLOP-HARRISON, Y. Control gates and micro-ecology: the pollen–stigma interaction in perspective. *Annals of Botany*, 85, 5–13. 2000.

JESSON, L.K, BARRETT, S.C.H. Enantiostyly in *Wachendorfia* (Haemodoraceae): The influence of reproductive systems on the Maintenance of the polymorphism. **American Journal of Botany** 89(2): 253–262. 2002.

MARAZZI B., CONTI E., ENDRESS P.K. Diversity in anthers and stigmas in the buzz-pollinated genus *Senna* (Leguminosae, Cassinae). **International Journal of Plant Sciences**, 168, 371–391. 2007.

MARAZZI, B., & ENDRESS, P. K.. Patterns and development of floral asymmetry in *Senna* (Leguminosae, Cassiinae). **American Journal of Botany**, 95(1), 22-40. 2008.

MORA-CARRERA, E., CASTAÑEDA-ZÁRATE, M., FORNONI, J., BOEGE, K., & DOMÍNGUEZ, C. A. On the adaptive value of monomorphic versus dimorphic enantiostyly in *Solanum rostratum*. *Annals of botany*, 123(1), 205-212. 2019.

NASCIMENTO, E. A. do; DEL-CLARO, K. Floral visitors of *Chamaecrista debilis* (Vogel) Irwin & Barneby (Fabaceae-Caesalpinioideae) at cerrado of Estação Ecológica de Jataí, São Paulo State, Brazil. **Neotropical entomology**, v. 36, n. 4, p. 619-624, 2007.

NIESENBAUM, R. A. Os efeitos do tamanho da carga polínica e diversidade de doadores no desempenho polínico, aborto seletivo e vigor da progênie em *Mirabilis jalapa* (Nyctaginaceae). **American Journal of Botany**, v. 86, n. 2, pág. 261-268, 1999.

PROCTOR, M.; YEO, P.; LACK, A. The natural history of pollination. Oregon. Editora Timber Press, 1996.

RICHARDSON, T. E., AND A. G. STEPHENSON. Effects of parentage and size of pollen load on progeny performance in *Campanula americana*. 1992 *Evolution* 46:1731–1739. 1992.

VALLEJO-MARÍN, M. et al. Division of labor within flowers: heteranteria, a floral strategy to reconcile contrasting pollen fates. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 22, n. 4, pág. 828-839, 2009.

WOLOWSKI, M.; FREITAS, L. Sistema reprodutivo e polinização de *Senna multijuga* (Fabaceae) em Mata Atlântica Montana. **Rodriguésia**, v. 61, p. 167-179, 2010.

SANTOS, T. T.; OLIVEIRA, A. C. S.; QUEIROZ, R. T.; SILVA, J. S. O gênero *Senna* (Leguminosae-Caesalpinioideae) no município de Caetité, Bahia, Brasil. **Rodriguésia** 71: e01222018. 2020.

STUDER, A.; NUSBAUMER, L.; SPICHIGER, R. Biodiversidade da Reserva Biológica de Pedra Talhada. **Genève**, 1-818.2015.

SUTHERLAND, S. and DELPH, L. F. On the importance of male fitness in plants: patterns of fruit-set. **Ecology**, 65(4), 1984, pp. 1093-1104.

ANEXOS

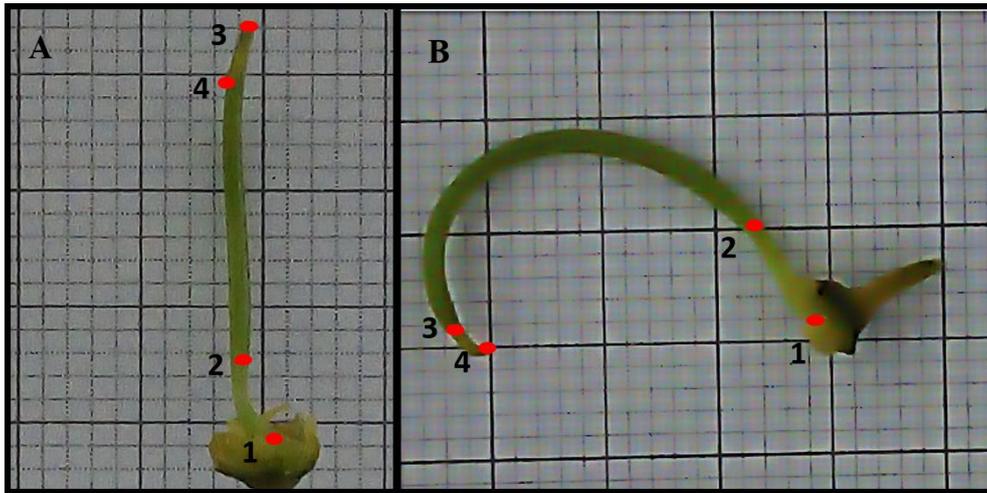


Figura 1: Imagem da vista frontal (A) e lateral (B) do pistilo de *S. aversiflora*, contendo os pontos homólogos.

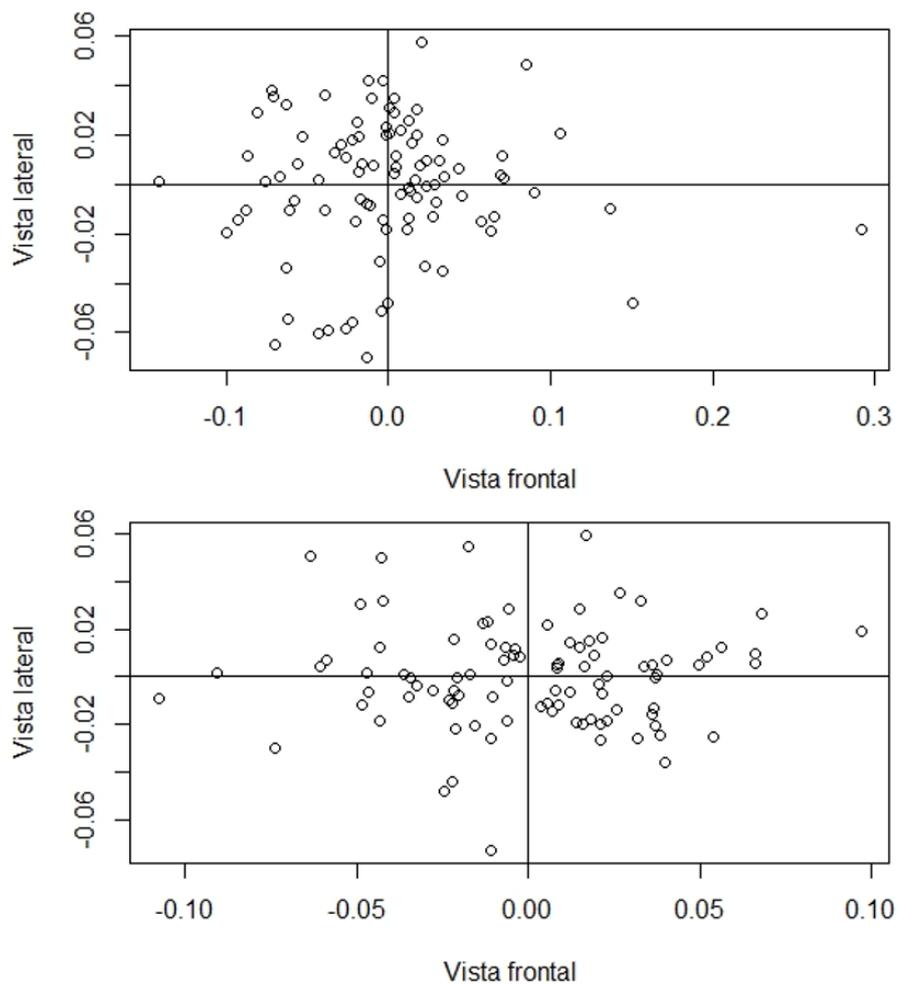


Figura 2: Distribuição dos componentes de deformação parcial (RW1 e RW2) e representações de padrões de forma para cada pistilo de *S. aversiflora* do teste de autopolinização.

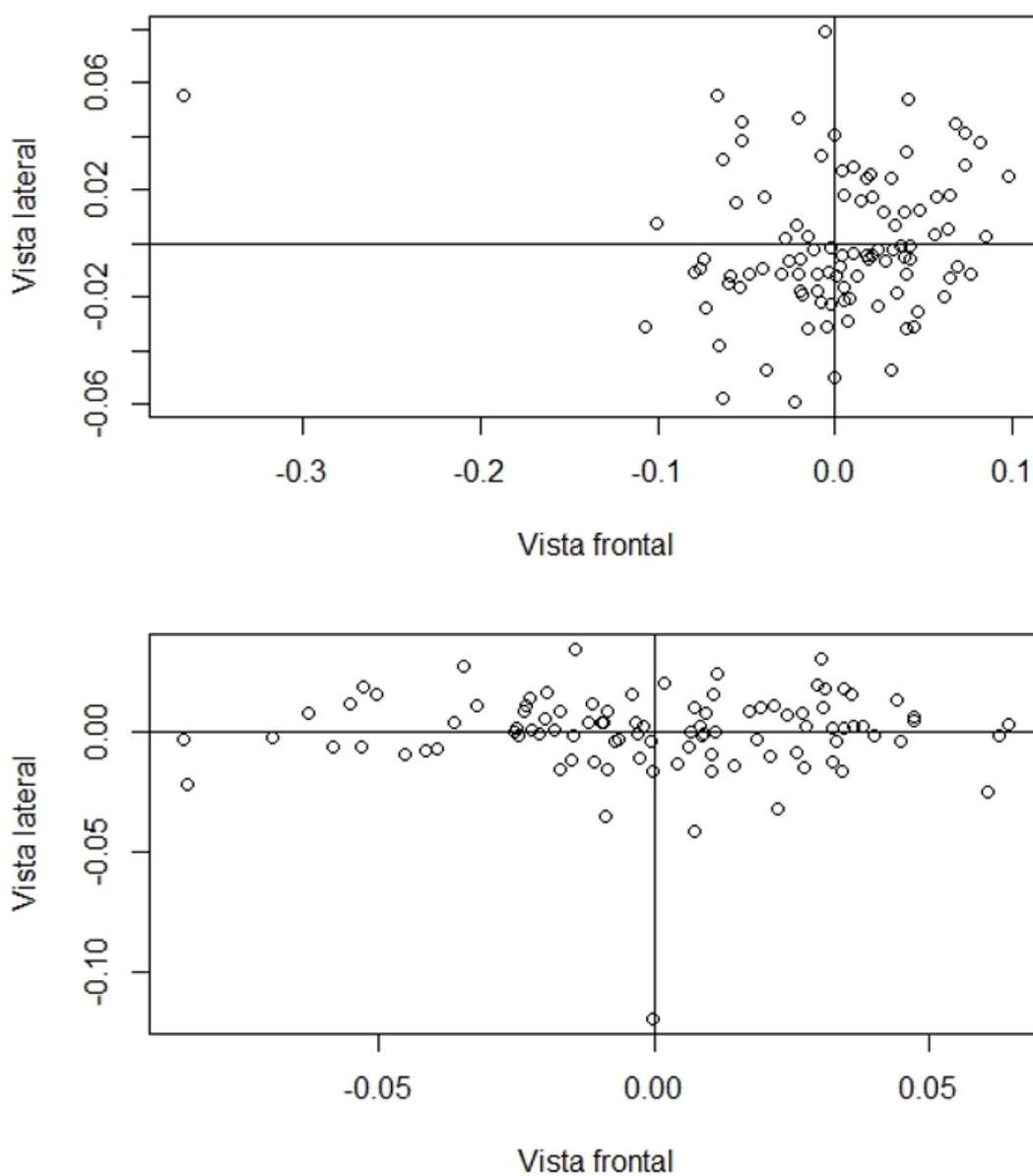


Figura 3: Distribuição dos componentes de deformação parcial (RW1 e RW2) e representações de padrões de forma para cada pistilo de *S. aversiflora* do teste de eficiência de coleta de pólen.

Tabela 1. Seleção fenotípica dos atributos T.E.L (tamanho do estilete vista lateral), RW1L (forma vista lateral) e amplitude do pistilo através do sucesso reprodutivo (w – densidade de pólen no estigma) de *Senna aversiflora* considerando os teste de autopolinização (ATP) e eficiência (EFI). Valores \pm erro padrão dos gradientes de seleção direcional (β_i), quadrática (γ_{ii}) e correlacional (γ_{ij}) são apresentados. A significância estatística é representada por asteriscos, onde $p < 0.05$ e os valores apresentados abaixo.

			Atributos i	Bi \pm SE	Yi \pm SE	Atributo j	
						RW1 L	Amplitude
			Yij \pm SE				
ATP	Pólen	T.E.L	-0.251 \pm 0.178	0.204 \pm 0.232	-0.062 \pm 0.206	-	
		RW1 L	0.193 \pm 0.175	0.132 \pm 0.252	-	-	
Teste	Pólen	T.E.L.	0.301 \pm 0.172	-0.178 \pm 0.235	0.088 \pm 0.138	-0.141 \pm 0.160	
		RW1 L	-0.018 \pm 0.168	0.001 \pm 0.267	-	0.062 \pm 0.193	
		Amplitude	-0.345 \pm 0.177*	0.464 \pm 0.286	-	-	

Tabela 2. Correlação entre as variáveis tamanho e forma (RW1 e RW2), em suas vistas laterais e frontais, e amplitude do pistilo no teste de eficiência, usando a correlação de Spearman. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$

Vista	Variáveis	Lateral			Frontal			Amplitude
		Tamanho	RW1	RW2	Tamanho	RW1	RW2	
	Tamanho	1	0.03	-0.01	0.23	0.04	0.38***	-0.03
Lateral	RW1	0.03	1	0.01	-0.06	0.13	0.03	0.09
	RW2	-0.01	0.01	1	-0.07	0.36**	-0.27**	0.11
Frontal	Tamanho	0.23	-0.06	-0.07	1	-0.14	0	0.17
	RW1	0.04	0.13	0.36**	-0.14	1	0.01	0.22*
	RW2	0.38***	0.03	-0.27*	0	0.01	1	-0.15
	Amplitude	-0.03	0.09	0.11	0.17	0.22*	-0.15	1

Tabela 3. Correlação entre as variáveis tamanho e forma (RW1 e RW2) do pistilo, em suas vistas laterais e frontais, no teste de autopolinização, usando a correlação de Spearman. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$

Vista	Teste de autopolinização	Lateral			Frontal		
		Tamanho	RW1	RW2	Tamanho	RW1	RW2
Lateral	Tamanho	1	-0.03	-0.21*	0.06	-0.11	0.23*
	RW1	-0.03	1	0.01	0.2	0.3**	0.11
	RW2	-0.21*	0.01	1	-0.05*	0.04	-0.04
Frontal	Tamanho	0.06	0.2*	-0.05	1	-0.22	0.08
	RW1	-0.11	0.3**	0.04	-0.22*	1*	0.17
	RW2	0.23*	0.11	-0.04	0.08	0.17	1

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados encontrados nesta dissertação, demonstram a importância da realização de estudos relacionados à aptidão, reprodução e morfologia funcional em espécies representantes da subtribo Cassiinae, principalmente por serem enantioestílicas e por apresentarem aspectos reprodutivos desconhecidos.

A dinâmica de floração e os diferentes aspectos da funcionalidade encontrada neste estudo em *Chamaecrista fasciculata*, *Senna uniflora*, *S. aversiflora*, revelam a necessidade de investigações não só apenas no grupo dessas espécies, mas em outras espécies enantioestílicas, desvendando as diferentes estratégias e significado evolutivo de seus mecanismos reprodutivos. Assim como foi verificada a variação na dinâmica de produção e sobreposição de morfos, adicionando conhecimento em áreas ainda não exploradas.

A morfologia também entra como importante fator no sucesso reprodutivo, tendo impacto no fitness, assim como verificado em *S. aversiflora*, que embora a forma do estilete não tenha indicado influência na densidade do pólen nos estigmas, a amplitude de seu deslocamento mostrou relação com menores amplitudes, contendo maiores densidades. Ficando evidente, a partir de nossos resultados, a necessidade de novas investigações acerca da morfologia e aspectos reprodutivos de enantioestílicas de Cassiinae.