



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA

BRUNA LETÍCIA PEREIRA BRAGA

**RECIPROCIDADE FLORAL E MORFOFUNCIONALIDADE DE
ESTILETES EM UMA ESPÉCIE ENANTIOSTÍLICA MONOMÓRFICA
DO GÊNERO *Senna* Mill. (FABACEAE-CAESALPINIOIDEAE)**

RECIFE, 2021

BRUNA LETÍCIA PEREIRA BRAGA

**RECIPROCIDADE FLORAL E MORFOFUNCIONALIDADE DE
ESTILETES EM UMA ESPÉCIE ENANTIOSTÍLICA MONOMÓRFICA
DO GÊNERO *Senna* Mill. (FABACEAE-CAESALPINIOIDEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Botânica, da Universidade
Federal Rural de Pernambuco, como parte dos
requisitos para a obtenção do título de Mestra
em Botânica.

Orientador: Dr. Natan Messias de Almeida
Coorientador: Dr. Hélder Nagai Consolaro
Coorientador: Dr. Jefferson Thiago Souza

RECIFE, 2021

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)

B813r

Braga, Bruna Leticia Pereira

Reciprocidade floral e morfo-funcionalidade de estiletos em uma espécie enantiostrófica monomórfica do gênero *Senna* Mill. (Fabaceae-Caesalpinioideae) / Bruna Leticia Pereira Braga. - 2021.
58 f. : il.

Orientador: Natan Messias de Almeida.

Coorientador: Helder Nagai Consolaro.

Inclui referências e anexo(s).

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Botânica, Recife, 2021.

1. Polimorfismos florais. 2. Hecogamia recíproca. 3. Heteranteria. 4. Enantiostrófia. 5. Polinização por vibração. I. Almeida, Natan Messias de, orient. II. Consolaro, Helder Nagai, coorient. III. Título

CDD 581

BRUNA LETÍCIA PEREIRA BRAGA

RECIPROCIDADE FLORAL E MORFOFUNCIONALIDADE DE ESTILETES EM UMA
ESPÉCIE ENANTIOSTÍLICA MONOMÓRFICA DO GÊNERO *Senna* Mill. (FABACEAE-
CAESALPINIOIDEAE)

Dissertação apresentada e _____ em ____/____/____

Orientador:

Prof. Dr. Natan Messias de Almeida

Coorientadores:

Prof. Dr. Hélder Nagai Consolaro

Prof. Dr. Jefferson Thiago Souza

Examinadores:

Prof^a. Dra. Cibele Cardoso de Castro - UFRPE-UAG (Titular)

Prof. Dr. André Rodrigo Rech – UFVJM (Titular)

Prof^a. Dra. Ana Virgínia de Lima Leite – UFRPE (Suplente)

Prof. Dr. Vinícius Lourenço Garcia de Brito – UFU (Suplente)

Recife, 2021

A Deus, à minha família e amigos pelo apoio constante e ao meu anjo Renan Kaique (*in memoriam*), minha maior saudade e inspiração como profissional e ser humano.

Agradecimentos

À minha mãe, meu pai, irmãos e sobrinha, meus bens mais preciosos, pelo apoio nas minhas aspirações pessoais e profissionais.

Ao meu avô, Chico Pereira, minha fonte de sabedoria; sou grata pelo tempo que investiu nos meus estudos e por sempre acreditar em mim.

Aos meus amigos e familiares que me deram todo o suporte necessário quando adoeci durante o curso; não teria como citar todos aqui, pois correria o risco de esquecer alguém (vocês são muitos). Sou grata a cada palavra, afeto e auxílio financeiro que proporcionaram a recuperação da minha saúde física para conseguir chegar até aqui.

Ao meu orientador Natan Messias por todas as conversas e experiências compartilhadas. Sou grata pela sua dedicação e por toda a sua paciência comigo em cada etapa, como também pelas oportunidades acadêmicas que vêm enriquecendo meu crescimento profissional.

Aos meus coorientadores Jefferson Thiago e Hélder Nagai pelas contribuições que muito enriqueceram o meu trabalho e o meu crescimento profissional e ao Raphael Matias pela parceria, análises e trocas que fortaleceram nosso trabalho.

Aos integrantes e ex-integrantes do Grupo de Pesquisa em Ecologia e Conservação de Ecossistemas (UECE/FECLI) que me deram suporte em todo o trabalho de campo. Gratidão pelos momentos compartilhados e por todo o apoio de sempre.

Ao Grupo de Pesquisa Fragilidade Ecológica de Angiospermas pelos momentos compartilhados durante os minicursos, campos e eventos.

Ao Professor Me. Célio Moura Neto pela força em campo, pelas identificações, e por estar sempre disposto a colaborar com a formação dos seus ex alunos. Obrigada por tudo, mestre!

Ao suporte técnico do Laboratório de Ecologia Reprodutiva de Angiospermas da UFRPE e do Laboratório de Pesquisa e Ensino de Biologia da Universidade Federal do Pernambuco pelos equipamentos e materiais disponibilizados para a esta pesquisa.

Ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade pelo suporte logístico oferecido.

Ao CNPQ pela bolsa concedida.

Ao Programa de Pós Graduação em Botânica da Universidade Federal Rural do Pernambuco, a casa na qual conquistei minha formação e ao apoio logístico e laboratorial da Faculdade de Educação, Ciências e Letras de Iguatu, minha antiga casa. Gratidão!

Lista de figuras

- Figura 1.** Representação esquemática da posição relativa de estigmas e anteras em flores direitas (A), esquerdas (B) e centrais (C e D) de *Senna rugosa*. FA= anteras de alimentação; PA1 e PA2= anteras de polinização opostas ao estigma; PA3= anteras de polinização laterais ao estigma.....49
- Figure 2.** Representação esquemática da mensuração do afastamento horizontal (Figura A, letra a), altura (Figura A, letra b), profundidade (Figura B, letra c) e angulação (Figura C, letra d) dos órgãos sexuais de *Senna rugosa*, exemplificados pela morfometria do estigma.....49
- Figura 3.** Bloxplots da proporção dos tipos florais morfológicos (A) e funcionais (B) em indivíduos de *Senna rugosa* estudados na FLONA Araripe, Ceará, Brasil. A funcionalidade de acordo com o tipo floral morfológico é mostrada em C. Os pontos cinzas mostram os dados observados. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0.05$).....50
- Figura 4.** Gráficos de dispersão tridimensionais das três medidas feitas nos estigmas e anteras de polinização das flores direitas e esquerdas de *Senna rugosa* estudadas na FLONA Araripe, Ceará, Brasil. As figuras A e B mostram estigmas com anteras intermorfo e as figuras C e D mostram estigmas com anteras intramorfo.....51
- Figura 5.** Gráficos circulares considerando as medidas de angulação e profundidade de estigmas (linhas azuis) e diferentes anteras de polinização (linhas pretas) de flores direitas e esquerdas de *Senna rugosa* estudadas na FLONA Araripe, Ceará, Brasil. Cada círculo representa a vista frontal de um órgão sexual, mostrando sua variação dentro de cada tipo floral. O eixo vertical (0-6 mm) representa a profundidade do respectivo órgão sexual..... 51
- Figura 6.** Gráfico de dispersão da distância horizontal dos pistilos de flores direitas (preto) e esquerdas (branco) de *Senna rugosa* estudados na FLONA Araripe, Ceará, Brasil. Os pistilos de cada tipo floral foram classificados pela distância horizontal para ilustrar sua variação. A área sombreada indica um intervalo em que os pistilos foram considerados funcionalmente centrais.....52

Lista de tabelas

- Tabela 1.** Visitantes florais e frequência de visitas em 131 horas de observação em indivíduos de *Senna rugosa* estudados na FLONA Araripe, Ceará, Brasil.....47
- Tabela 2.** Morfometria das flores de *Senna rugosa* para o cálculo da inacurácia: média (\pm variância) dos estigmas e anteras de polinização nas flores direitas e esquerdas. Valores negativos de distância horizontal indicam que o órgão está posicionado à esquerda do centro floral e valores positivos à direita..... 47
- Tabela 3.** Estimativas de inacurácia na reciprocidade intra e intermofo em *Senna rugosa* na FLONA Araripe, Ceará, Brasil. A inacurácia total para cada tipo de órgão (coluna 5) é a soma dos valores de inacurácia da distância horizontal, altura e profundidade (colunas 2, 3 e 4). Os valores entre parênteses representam porcentagens da inacurácia total.....48

Sumário

RESUMO GERAL	9
GENERAL ABSTRACT.....	10
1. INTRODUÇÃO GERAL	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Enantioestilia no gênero <i>Senna</i> Mill. (Fabaceae-Caesalpinioideae).....	13
2.2 Polinização por vibração na subtribo Cassiinae.....	15
2.3 Reciprocidade floral x Avaliação da reciprocidade em espécies enantioestílicas.....	16
2.4 Dinâmica de deposição e captação pólen em Cassiinae x Variações atípicas na enantioestilia.....	18
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
4. CAPÍTULO 1:	23
RESUMO	25
INTRODUÇÃO.....	26
MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
RESULTADOS	35
DISCUSSÃO.....	38
AGRADECIMENTOS	43
LITERATURA CITADA.....	44
5. ANEXOS.....	53

RESUMO GERAL

A ocorrência da reciprocidade floral entre os morfos direito e esquerdo na enantiostilia se faz necessária ao estímulo do fluxo polínico cruzado e à redução das chances de autofecundação. Espécies monomórficas, pela ocorrência dos dois morfos em um mesmo indivíduo, possibilitam a geitonogamia, o que confronta o significado evolutivo da enantiostilia. A avaliação da reciprocidade é difícil na enantiostilia, pela inexistência de métodos aplicados de mensuração do posicionamento das estruturas reprodutivas nas flores, uma vez que ocorrem mudanças na configuração das peças florais durante as visitas, sobretudo em Cassiinae. Dentro da subtribo também podem ocorrer variações atípicas nos padrões de deposição e captação de pólen entre as espécies, o que pode levar à novas perspectivas à história natural do grupo. O presente trabalho objetivou avaliar a reciprocidade floral intra e intermorfo e confrontar padrões de morfologia e morfofuncionalidade dos morfos direitos e esquerdos de uma espécie enantiostílica monomórfica do gênero *Senna*. A pesquisa foi realizada na Floresta Nacional do Araripe, localizada no extremo sul do Ceará. Foi estudada uma população de *Senna rugosa* (G. Don) H. S. Irwin e Barneby, espécie enantiostílica monomórfica polinizada por vibração. Descrevemos a variação na posição dos órgãos sexuais e usamos inacurácia adaptativa para inferir a reciprocidade intra e intermorfo. Foi verificada a razão de ocorrência dos diferentes tipos florais baseado em critério morfológico e morfofuncional, além da guilda de visitantes florais, o sistema de compatibilidade e a viabilidade polínica. Os padrões de reciprocidade não foram semelhantes entre flores com estigmas direitos e esquerdos. A hercogamia entre estigmas e anteras de polinização mais distantes do estilete é gerada principalmente pelo afastamento horizontal, enquanto a profundidade é a medida que gera maior hercogamia com anteras de polinização mais próximas ao estilete. Em flores esquerdas, a hercogamia é gerada principalmente pelo afastamento horizontal, independente da antera considerada. Os indivíduos exibiram proporção semelhante dos tipos florais considerando o critério morfológico. Contudo, considerando a morfofuncionalidade, a proporção de flores diferiu, com menor proporção de flores funcionalmente esquerdas. A espécie foi visitada por sete espécies de abelhas, apresentou um certo nível de autocompatibilidade e os grãos de pólen das anteras de polinização e alimentação tiveram alta viabilidade. *Senna rugosa* é o primeiro relato de uma possível divisão de funções na captação do pólen entre flores de morfos opostos, evidenciando variações nos padrões morfológico e morfofuncionais das flores que podem estar ligados às pressões seletivas como segurança reprodutiva e aumento das aptidões na captura de pólen em estiletos em posições específicas.

Palavras chave: polimorfismos florais; hercogamia recíproca; heteranteria; enantiostilia; polinização por vibração.

GENERAL ABSTRACT

The occurrence of floral reciprocity between the right and left morphs in enantiostilia is necessary to stimulate the crossed pollen flow and to reduce the chances of self-fertilization. Monomorphic species, due to the occurrence of two morphs in the same individual, make geitonogamy possible, which confronts the evolutionary meaning of enantiostyly. The evaluation of reciprocity is difficult in enantiostyly, due to the lack of applied methods to measure the positioning of reproductive structures in flowers, since there are changes in the configuration of floral pieces during visits, especially in Cassiinae. Within the subtribe, atypical variations in the patterns of pollen deposition and uptake between species may also occur, which may lead to new perspectives on the group's natural history. The present work aimed to evaluate the intra and intermorphic floral reciprocity and to confront patterns of morphology and morpho-functionality of the right and left morphs of a monomorphic enantiostylic species of the genus *Senna*. The research was carried out in the Araripe National Forest, located in the extreme south of Ceará. A population of *Senna rugosa* (G. Don) H. S. Irwin and Barneby, a monomorphic enantiostylic species pollinated by vibration, was studied. We describe the variation in the position of sexual organs and use adaptive inaccuracy to infer intra and intermorphic reciprocity. The reason for the occurrence of the different floral types was verified based on morphological and morpho-functional criteria, in addition to the guild of floral visitors, the compatibility system and pollen viability. Reciprocity patterns were not similar between flowers with right and left stigmas. Hercogamy between stigmas and pollination anthers furthest from the stylet is mainly generated by horizontal spacing, while depth is the measure that generates the greatest hercogamy with pollination anthers closer to the stylet. In left flowers, hercogamy is generated mainly by horizontal spacing, regardless of the anther considered. The individuals showed a similar proportion of the floral types considering the morphological criterion. However, considering the morpho-functionality, the proportion of flowers differed, with a lower proportion of functionally left flowers. The species was visited by seven species of bees, showed a certain level of self-compatibility and the pollen grains from the pollination and feeding anthers had high viability. *Senna rugosa* is the first report of a possible division of functions in pollen uptake between flowers of opposite morphs, showing variations in the morphological and morpho-functional patterns of flowers that may be linked to selective pressures such as reproductive safety and increased skills in pollen capture in stiletos in specific positions.

Keywords: floral polymorphisms; reciprocal hercogamy; heterantery; enantiostyly; buzz pollination.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Polimorfismos florais que apresentam arranjos recíprocos de órgãos masculinos e femininos entre os morfos florais caracterizam um tipo hercogamia denominada hercogamia recíproca (BARRETT, 2002). A enantiostilia é um exemplo de hercogamia recíproca e que se configura com variações no posicionamento da estrutura sexual feminina, de maneira que o gineceu pode estar posicionado à esquerda ou à direita do centro floral, caracterizando flores que formam imagens especulares umas das outras (JESSON e BARRETT 2002b, ALMEIDA et al. 2013a). Este dimorfismo pode ocorrer nas formas monomórfica e dimórfica: espécies monomórficas apresentam, no mesmo indivíduo, flores dos morfos direito e esquerdo, enquanto que em espécies dimórficas, flores de cada morfo ocorrem em indivíduos diferentes (JESSON et al. 2003). Estudos acerca da enantiostilia são descritos há muitos anos, no entanto, aspectos relacionados à sua funcionalidade, evolução e adaptação ainda não estão bem estabelecidos na literatura.

Dentre os grupos que abrigam espécies enantiostílicas está a subtribo Cassiinae (Fabaceae-Caesalpinioideae), que abriga os gêneros *Senna*, *Cassia* e *Chamaecrista*. Todos os gêneros possuem atributos florais e aspectos ecológicos em comum (ALMEIDA et al., 2015a), como presença de flores amarelas denominadas na literatura como flores de pólen (VOGEL, 1978) que são polinizadas exclusivamente por abelhas, em um processo denominado “buzz pollination” ou polinização por vibração (BUCHMANN, 1983; VALLEJO-MARÍN, 2019). As espécies evidenciam a heteranteria (presença de dois tipos de estames em uma única flor, onde as anteras são divididas entre as funções de alimentação e polinização; BARRETT, 2002; ALMEIDA et al., 2013a) e uma pétala côncava que auxilia no transporte de pólen das anteras maiores para um dos lados do dorso da abelha (MÜLLER, 1883; WOLOWSKI e FREITAS, 2010). O gênero *Senna* é caracterizado por espécies enantiostílicas monomórficas que por isso possibilitam a geitonogamia, o que contradiz o significado evolutivo da enantiostilia (que teria evoluído por evitar processos endogâmicos capazes de promover a polinização cruzada entre indivíduos da população; BARRETT et al., 2000; CARVALHO e OLIVEIRA 2003; WESTERKAMP 2004; LAPORTA 2005; ALMEIDA 2013a; ALMEIDA 2013b; MORAIS et al., 2020a).

Flores enantiostílicas dependem da ocorrência de reciprocidade entre anteras e estigmas de morfos direitos e esquerdos, visto que, na polinização dessas espécies, a deposição e a captação de pólen ocorrem em locais opostos do corpo da abelha (JESSON; BARRETT, 2005; ALMEIDA et al., 2013a; ALMEIDA et al., 2013b; ALMEIDA et al., 2015b). Dessa forma, a reciprocidade floral está relacionada ao encaixe preciso da flor no corpo do polinizador

durante as visitas florais (BARRETT e SHORE, 2008). Modelos matemáticos propostos para o estudo da reciprocidade floral em heterostilia (um outro exemplo de hercogamia recíproca) revelam que quanto mais elevada a correspondência das estruturas florais entre os morfos, maior a possibilidade de cruzamento e sucesso reprodutivo ótimo nessas espécies (ARMBRUSTER et al., 2017). Para a avaliação da reciprocidade nesses grupos têm sido utilizados modelos matemáticos, baseados na imprecisão adaptativa, capazes de avaliar a aptidão das espécies (ARMBRUSTER et al., 2017; MATIAS; PÉREZ-BARRALES; CONSOLARO, 2020). Além disso, ensaios recentes buscaram avaliar padrões de fluxo polínico dentro da família Vochysiaceae avaliando morfometria floral, carga polínica nos visitantes florais e fluxo de pólen (MORAIS et al., 2020a). Contudo, a literatura ainda carece de métodos aplicados à reciprocidade em espécies enantiostílicas. Vale ressaltar também que, até o presente, ainda não foram propostas na literatura avaliações da reciprocidade floral na enantiostilia baseadas na imprecisão adaptativa proposta por Armbruster et al. (2009; 2017).

Embora o padrão recíproco entre anteras e estigmas possa ser encontrado na enantiostilia, estudos apontam para a existência de variações atípicas, sobretudo dentro da subtribo Cassiinae (ALMEIDA et al., 2013b; ALMEIDA et al., 2015b). Estudos apontam para uma produção desigual de morfos direitos e esquerdos entre os indivíduos de espécies monomórficas, na qual um indivíduo pode tornar-se funcionalmente direito ou esquerdo, contudo a proporção permanece semelhante na população (isopletia), possibilitando a redução nas taxas de geitonogamia para este tipo enantiostílico (ALMEIDA et al., 2013b; ALMEIDA et al., 2018). A existência de um terceiro morfo em *Chamaecrista flexuosa* (morfo central; ALMEIDA et al., 2013b) expõe a diversidade de mecanismos reprodutivos dentro da subtribo, evidenciando a necessidade de novos estudos dentro do grupo a fim de investigar quais estratégias reprodutivas estão garantindo o sucesso reprodutivo dessas espécies. Neste sentido, divergências entre morfologia e funcionalidade dos morfos florais, conforme relatado pelos autores supracitados, podem configurar novas estratégias reprodutivas, trazendo novas perspectivas à história natural do grupo.

Este estudo possui os seguintes objetivos: 1) avaliar a reciprocidade entre anteras de polinização e estigmas intra e intermorfo; 2) avaliar se os parâmetros de altura, profundidade ou horizontalidade conduzem a hercogamia nas flores de *S. rugosa*; 3) investigar a razão dos morfos (isopletia) a partir do posicionamento da pétala e sob o aspecto morfofuncional (posicionamento do estigma).

2. REVISÃO DE LITERATURA

Esta revisão de literatura é uma abordagem teórica do estado da arte acerca dos principais temas norteadores desta pesquisa: enantioestilia, polinização por vibração, reciprocidade floral, inacurácia adaptativa e padrões de deposição e captação de pólen. Teve como base de dados teses e artigos publicados entre os anos 1978 e 2021 localizados no portal de periódicos da CAPES, Scielo, Google acadêmico e sugestões do Mendeley. Tivemos como palavras chave: enantioestilia, reciprocidade floral, hercogamia recíproca, polinização por vibração, *Senna* Mill. e fluxo polínico. Todos os termos foram procurados em português e inglês.

2.1 Enantioestilia no gênero *Senna* Mill. (Fabaceae-Caesalpinioideae)

A enantioestilia é um polimorfismo floral que se configura com o gineceu deflexionado para a direita ou para a esquerda do eixo de simetria floral (JESSON; BARRETT, 2002a). Esse tipo de configuração das estruturas reprodutivas resulta em flores que formam imagens especulares umas das outras (BARRETT, 2002). A enantioestilia é recorrente em aproximadamente 17 famílias de 11 ordens de angiospermas e apresenta-se nas formas monomórfica e dimórfica. Espécies monomórficas produzem, no mesmo indivíduo, flores dos morfos direito e esquerdo, enquanto que em espécies dimórficas, flores de cada morfo ocorrem em indivíduos diferentes, sendo relatadas em apenas 3 famílias, distribuídas em 2 ordens restritas às monocotiledôneas (JESSON et al., 2003).

Na enantioestilia monomórfica os indivíduos podem apresentar inflorescências apenas com flores direitas ou esquerdas, além de inflorescências compostas por flores direitas e esquerdas (BARRETT, 2002). As espécies monomórficas são mais abundantes, abrangendo cerca de dez famílias de monocotiledôneas e dicotiledôneas (JESSON, 2002). Dentro da família Fabaceae, a subtribo Cassiinae abriga espécies distribuídas entre os gêneros *Senna*, *Cassia* e *Chamaecrista*. O gênero *Senna* Mill. apresenta distribuição pantropical, com aproximadamente 350 espécies (LEWIS; IRWIN; BARNEBY, 1984; MARAZZI e SANDERSON, 2010).

Flores enantioestílicas são conhecidas há muitos anos, porém suas reais funções, genética e significados evolutivos e adaptativos ainda não estão bem definidos na literatura de plantas. Jesson e Barrett (2002b) apontam em seus estudos para um locus mendeliano governando a herança de orientação do órgão reprodutivo feminino em espécies dimórficas, de forma que flores direitas possuem dominância sobre flores esquerdas, reforçando também que

as funções de assimetria sexual promovem a polinização cruzada em espécies polinizadas por abelhas. Dulberger (1981) afirma que sua função é a proteção do gineceu durante o processo de polinização por vibração, visto que o movimento da abelha poderia danificar este órgão reprodutor por sua fragilidade. Contudo, em espécies monomórficas, apesar de não ser possível anular o processo de geitonogamia, o polimorfismo é estratégico para reduzir o contato do pólen na mesma flor, conforme apontado em um estudo com flores de espécies simpátricas de *Diplusodon* (Lythraceae; BARROS, 1996), estando assim diretamente relacionado ao fluxo de pólen entre os morfos (MORAIS et al., 2020).

A partir de características morfofuncionais como local de deposição de pólen, reciprocidade, modo de deposição, quantidade de pétalas envolvidas nesse mecanismo e percurso do pólen, grupos de Cassiinae foram classificados em sete tipos enantiostílicos (ALMEIDA, et al. 2015b). No estudo, espécies do gênero *Senna* foram atribuídas a três tipos, nos quais ambos apresentam deposição e captura de pólen do dorso do polinizador, mas com caracteres peculiares que os diferenciam: **cana** é um tipo não-recíproco e a deposição de pólen no corpo do polinizador é direta, enquanto que no tipo **martiana** (não-recíproco) a deposição é indireta e conta com o ricochete em uma pétala; por último, o tipo **macranthera** é recíproco e a deposição de pólen ocorre de forma direta (ALMEIDA, et al. 2015b).

Estudos da biologia reprodutiva de espécies de *Senna* evidenciam a enantiostilia como polimorfismo floral: em *S. multijuga*, a enantiostilia, a heteranteria (presença de dois tipos de estames em uma única flor, onde as anteras são divididas entre as funções de alimentação e polinização; BARRETT, 2002; ALMEIDA et al., 2013a) e a existência de uma pétala côncava, em algumas espécies, que auxiliam no transporte de pólen das anteras maiores para um dos lados do dorso da abelha são aspectos florais que facilitam o processo de polinização na espécie (MÜLLER, 1883; WOŁOWSKI e FREITAS, 2010). *S. sylvestris* apresenta anteras porcidas e heteromorfas e enantiostilia do tipo monomórfica, de forma que flores de ambos os morfos ocorrem em uma mesma inflorescência (CARVALHO e OLIVEIRA, 2003).

Nesse sentido, grupos de Cassiinae apontam evidências de autocompatibilidade e autoincompatibilidade de ação tardia em espécies monomórficas, sobretudo dentro do gênero *Senna* (ALMEIDA et al., 2015a). Nesse estudo, *S. macranthera* e *S. macranthera* var. *pudibunda* apresentam sistemas autocompatíveis, deposição direta de pólen pelas anteras e em lados opostos do dorso da abelha. Contudo, esse padrão contrapõe o encontrado em *S. martiana*, uma espécie considerada atípica, com evidências de um sistema autoincompatível de ação tardia e deposição indireta de pólen e simultânea em ambos os lados do corpo do polinizador. Tais configurações morfofuncionais são imprescindíveis à promoção da polinização cruzada e,

consequentemente, ao sucesso reprodutivo dessas espécies (CARVALHO e OLIVEIRA, 2003; ALMEIDA et al., 2015a).

2.2 Polinização por vibração na subtribo Cassiinae

A subtribo Cassiinae (Fabaceae-Caesalpinioideae) apresenta características morfológicas florais específicas compartilhadas entre seus gêneros *Senna*, *Cassia* e *Chamaecrista* (ALMEIDA et al., 2015a). Suas flores são denominadas flores de pólen (VOGEL, 1978). Dentre os representantes do grupo, estão as flores de *Senna* que apresentam anteras poricidas, ofertam somente pólen como recurso e são exclusivamente melitófilas, visto que somente abelhas fêmeas grandes conseguem obter a coleta do recurso através da vibração nas anteras, processo esse denominado polinização por vibração ou “buzz pollination” (BUCHMANN, 1983; VALLEJO-MARÍN, 2019).

Na polinização por vibração, o pólen é liberado pelos poros localizados na extremidade das anteras através da vibração exercida pelas abelhas ou por ser espremido (“milking”) por elas (DULBERGER, 1981). Após a vibração, o pólen é depositado no dorso do polinizador, de forma que a polinização ocorre durante a próxima visita (em flores do mesmo indivíduo ou de indivíduos diferentes), quando o estigma toca o dorso da abelha em locais específicos, a depender do morfo floral, e capta o pólen ali depositado (BAHADUR; CHATURVEDI; SWAMY, 1990; ALMEIDA et al., 2013a).

Graças à vibração exercida pelas abelhas, a deposição pode ocorrer de forma indireta em flores enantiostílicas através de um mecanismo denominado ricochete. O pólen das anteras maiores é depositado contra as pétalas modificadas (côncavas), chegando ao dorso do polinizador, respeitando as leis físicas de incidência da luz (LAPORTA, 2005; WESTERKAMP, 2004; AMORIM et al., 2017). Em outro mecanismo descrito por Almeida et al. (2013a) em *Chamaecrista ramosa*, denominado “looping”, o pólen percorre a superfície interna das pétalas arqueadas por meio de um giro, sendo direcionado ao dorso do polinizador. Em *Senna martiana* foi registrada a ocorrência desse mecanismo de deposição, na qual, além da deposição simultânea em ambos os lados do polinizador, expandindo a área de captura de pólen, o pólen é depositado indiretamente com o auxílio das pétalas, um padrão atípico dentro do gênero (ALMEIDA et al., 2015a; ALMEIDA et al., 2015b).

Em algumas espécies, a captação de pólen pelo estigma ocorre na região ventral do polinizador quando as abelhas “abraçam” essas estruturas reprodutivas, como observado por

Carvalho e Oliveira (2003) em *S. silvestris*. Flores enantiostílicas dependem da vibração dos seus polinizadores, tanto para a liberação de pólen das anteras como para os processos de deposição de pólen no dorso das abelhas e captação de pólen pelo estigma, além de dar início à receptividade do estigma (ARCEO-GÓMEZ et al., 2011). Espécies do gênero também apresentam diferenças na morfometria floral, o que pode levar a uma seleção de polinizadores (PINHEIRO e SAZIMA, 2007). Nesse sentido, os autores observaram que a relação entre o tamanho floral e o tamanho do polinizador pode ser mais relevantes para definir o comportamento da abelha como pilhadora ou polinizadora do que o comportamento durante a visita floral, visto que abelhas maiores em flores maiores tem o contato do estigma com o seu dorso favorecido. Abelhas grandes do gênero *Xylocopa* e *Oxaea* são apontados como os principais polinizadores em *S. silvestris*, por exemplo (CARVALHO e OLIVEIRA, 2003). Portanto, espécies pequenas de polinizadores podem ser ineficientes na polinização de algumas espécies enantiostílicas por não tocarem as estruturas reprodutivas e por não exercerem uma vibração forte e eficiente para a liberação do pólen pelas anteras (ALMEIDA et al., 2013b).

2.3 Reciprocidade floral x Avaliação da reciprocidade em espécies enantiostílicas

Devido ao padrão de deposição e captação de pólen em locais específicos e opostos no corpo do polinizador de flores enantiostílicas, essas espécies dependem da ocorrência de uma reciprocidade entre o posicionamento das estruturas reprodutivas masculinas e femininas de morfos direitos e esquerdos (JESSON e BARRETT, 2005; ALMEIDA et al, 2013a; ALMEIDA et al., 2013b; ALMEIDA et al., 2015b). Dessa forma, reciprocidade floral está estritamente relacionada ao encaixe da flor no corpo do polinizador durante as visitas florais, nas quais ocorrerá a deposição e captação de pólen pelas anteras e estigma (BARRETT e SHORE, 2008). Quanto mais elevada a correspondência entre as estruturas florais em morfos opostos, maior a possibilidade de cruzamento intermorfo e formação de frutos e sementes (ARMBRUSTER *et al.*, 2017).

Na enantiostilia, as espécies podem ser classificadas a partir de variações nos padrões de posicionamento do androceu, caracterizando flores recíprocas e não recíprocas. Espécies recíprocas apresentam morfologia floral na qual o androceu está posicionado opostamente ao pistilo; dessa forma, quando o pistilo está rotacionado à direita do centro floral, os estames encontram-se à esquerda (flores direitas), podendo ocorrer também de forma inversa (configurando as flores esquerdas); enquanto que em espécies não recíprocas as flores não têm variação no posicionamento do androceu (JESSON e BARRETT, 2002a; JESSON e

BARRETT, 2003). A partir de tais configurações florais podem ser apontadas quatro formas de enantiostílicas: monomórfica recíproca, dimórfica recíproca, monomórfica não recíproca e dimórfica não recíproca (JESSON e BARRETT, 2003; ALMEIDA e CASTRO, 2019). Na hercogamia recíproca, o processo de polinização e posterior formação de frutos dentro da população depende diretamente da ocorrência de reciprocidade entre as estruturas reprodutivas masculinas e femininas (ALMEIDA et al., 2013a; BARRETT, 2002). Assim, estudos sugerem que o processo de evolução no posicionamento recíproco entre anteras polinizadoras e estigma em espécies enantiostílicas monomórficas pode ter relação com a eficiência da polinização cruzada (JESSON e BARRETT, 2005).

Em flores enantiostílicas recíprocas a deposição e captação de pólen ocorrem entre os morfos florais, de modo que flores direitas captam pólen no lado direito do dorso do polinizador e realizam deposição de pólen ao lado esquerdo, ocorrendo de maneira inversa em flores esquerdas (BAHADUR; CHATURVEDI; SWAMY, 1990). Isso evidencia a especificidade do sistema reprodutivo em depositar e captar pólen em áreas pontuais do corpo da abelha (ALMEIDA et al., 2015a; ALMEIDA et al., 2015b). Contudo, indivíduos monomórficos tendem a realizar geitonogamia pela ocorrência de ambos os morfos florais na mesma planta. Estudos apontam para uma produção desigual de morfos direitos e esquerdos entre os indivíduos de espécies monomórficas, na qual um indivíduo pode tornar-se funcionalmente direito ou esquerdo, contudo a proporção permanece semelhante na população (isopleia), possibilitando a redução nas taxas de geitonogamia para este tipo enantiostílico (ALMEIDA et al., 2013b; ALMEIDA et al., 2018)

A avaliação da reciprocidade floral em espécies heterostílicas pode ser realizada através de métodos relacionados às variações no posicionamento das estruturas reprodutivas em relação ao centro da flor, baseados na imprecisão adaptativa (ARMBRUSTER et al., 2017). Tais estudos são importantes para a obtenção de valores capazes de investigar como se comporta o *fitness* nessas espécies. Para isso são feitas medições (cálculos da inacurácia) da altura do estigma e sua antera recíproca para tal avaliação (ARMBRUSTER et al., 2017). Para os autores, os índices de reciprocidade (IR) na heterostilia objetiva demonstrar numericamente o grau de correspondência existente entre os órgãos sexuais recíprocos.

O cálculo para medição da inacurácia mede a razão entre a altura da antera e altura do estigma recíproco sobre a altura da antera e altura do estigma recíproco de cada morfo, calculando o grau de imprecisão (ARMBRUSTER et al., 2017). Valores do IR podem variar de zero, caracterizando a reciprocidade mínima, a um, a reciprocidade perfeita (RICHARDS e KOPTUR, 1993). Essas medições são importantes para relacionar a partir de modelos

matemáticos conceitos biológicos de morfologia floral e funcional, além de aspectos evolutivos e ecologia das flores heterostílicas (ARMBRUSTER et al., 2009). Os autores sugerem o uso dessas métricas para o estudo de outros polimorfismos florais como a enantiostilia. Apesar disso, ainda não foram encontradas na literatura de planta estudos de reciprocidade floral em enantiostilia baseados na imprecisão adaptativa.

Recentemente, Morais et al. (2020) investigaram padrões de fluxo polínico em espécies enantiostílicas monomórficas consideradas atípicas, dentro da família Vochysiaceae, na qual a morfometria floral, carga polínica nos visitantes florais e fluxo de pólen foram avaliados. Para avaliar a reciprocidade num plano sagital, os autores mensuraram as distâncias dos estigmas e anteras até o eixo da flor em ambos os morfos, comparando distâncias antera-flor de um morfo com distâncias estigma-flor do outro morfo, confrontando também distâncias entre anteras e estigmas dentro de cada unidade floral. Mesmo com alguns avanços, a literatura ainda carece de um padrão em métodos de mensuração da reciprocidade, sobretudo que consigam abranger grupos com variações morfométricas florais peculiares, como as espécies de Cassiinae, o que instiga à busca por novas métricas ou adaptações de métodos que já estão bem estabelecidos para outros polimorfismos.

2.4 Dinâmica de deposição e captação pólen em Cassiinae x Variações atípicas na enantiostilia

Flores hercogâmicas recíprocas apresentam padrões na transferência de pólen dentro da população e a dinâmica pode variar entre as espécies, de acordo com a morfologia e a funcionalidade das estruturas florais (BARRETT, 2002; CARVALHO e OLIVEIRA, 2003; LAPORTA, 2005). Na enantiostilia, a deposição e captação do pólen acontecem, na maioria das espécies, em lados opostos do corpo do polinizador (ALMEIDA et al., 2015a), de forma direta ou indireta. Na deposição direta, as anteras depositam jatos de pólen diretamente no corpo da abelha e na deposição indireta as anteras contam com o auxílio de pétalas modificadas que direcionam o pólen à regiões específicas do corpo do polinizador (ALMEIDA et al., 2013a; ALMEIDA et al., 2015a). Contudo, estudos evidenciam variações nos padrões de deposição e captação de pólen para espécies enantiostílicas.

Com a classificação de diferentes tipos enantiostílicos da subtribo Cassiinae, (descritos anteriormente no tópico 2.1), é possível perceber que as espécies se diferenciam de acordo com a forma e as funções dos órgãos florais e, conseqüentemente, evidenciam diferentes padrões de captura e depósito de pólen. Dessa forma, temos espécies que apresentam deposição indireta com o auxílio de um conjunto de pétalas modificadas, espécies que fazem uso de apenas

uma dessas pétalas, espécies que depositam pólen diretamente no corpo do polinizador e aquelas que não apresentam deposição recíproca, considerada um tipo de enantiofilia “atípica” (ALMEIDA et al., 2015b).

Variações atípicas em tais padrões podem resultar em alterações na funcionalidade de captura e deposição de pólen do polimorfismo floral, conforme identificado em *Chamaecrista flexuosa* (ALMEIDA et al., 2013b). O estudo evidenciou um padrão incomum de enantiofilia na espécie que apresenta um terceiro morfo funcionalmente central, devido à ampla variação na posição do gineceu dentro dos morfos. Dessa forma, a deposição de pólen ocorre em um amplo espaço no corpo do visitante, tornando maior a amplitude de captura de pólen pelo estigma, o que parece maximizar a polinização, favorecer consequentemente o sucesso reprodutivo e evidenciar novas perspectivas à funcionalidade da enantiofilia monomórfica. Contudo, poucos estudos tem sido descritos na literatura acerca desse tipo enantiofílico, o que sugere uma possível novidade dentro dos grupos de Cassiinae.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, N. M.; CASTRO, C. C.; Enantiostyly in Angiosperms. *In*: BAHADUR, B.; KRISHNAMURTHY, K. V.; GHOSE, M.; ADAMS, S. J. (org). **Asymmetry in plants**. 1. Ed. New York: CRC Press, 2019. p. 319-328
- ALMEIDA, N. M.; BEZERRA, T. T.; OLIVEIRA, C. R. S.; NOVO, R. R.; SIQUEIRA-FILHO, J. A.; OLIVEIRA, P. E.; CASTRO, C. C. Breeding systems of enantiostylous Cassiinae species (Fabaceae, Caesalpinioideae). **Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, [S. l.], v. 215, p. 9–15, 2015. a. DOI: 10.1016/j.flora.2015.06.003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.flora.2015.06.003>.
- ALMEIDA, N. M.; CASTRO, C. C.; LEITE, A. V. L.; NOVO, R. R.; MACHADO, I. C. Enantiostyly in *Chamaecrista ramosa* (Fabaceae-Caesalpinioideae): floral morphology, pollen transfer dynamics and breeding system. **Plant Biology**, [S. l.], v. 15, n. 2, p. 369–375, 2013. a. DOI: 10.1111/j.1438-8677.2012.00651.x. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1438-8677.2012.00651.x>.
- ALMEIDA, N. M.; CASTRO, C. C.; LEITE, A. V.; NOVO, R. R.; MACHADO, I. C. Floral polymorphism in *Chamaecrista flexuosa* (Fabaceae-Caesalpinioideae): a possible case of atypical enantiostyly? **Annals of Botany**, [S. l.], v. 112, n. 6, p. 1117–1123, 2013. b. DOI: 10.1093/aob/mct188. Disponível em: <https://academic.oup.com/aob/article-lookup/doi/10.1093/aob/mct188>.
- 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**, [S. l.], v. 17, n. 3, p. 740–745, 2015. b. DOI: 10.1111/plb.12283. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/plb.12283>.
- 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. Functional dimorphic enantiostyly in monomorphic enantiostylous species of the subtribe Cassiinae (Fabaceae-Caesalpinioideae). **Plant Biology**, [S. l.], v. 20, n. 4, p. 797–801, 2018. DOI: 10.1111/plb.12718. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/plb.12718>.
- AMORIM, T.; MARAZZI, B.; SOARES, A. A.; FORNI-MARTINS, E. R.; MUNIZ, C. R.; WESTERKAMP, C. Ricochet pollination in *Senna* (Fabaceae) - petals deflect pollen jets and promote division of labour among flower structures. **Plant Biology**, [S. l.], v. 19, n. 6, p. 951–962, 2017. DOI: 10.1111/plb.12607. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/plb.12607>.
- ARCEO-GÓMEZ, G.; MARTÍNEZ, M. L.; PARRA-TABLA, V.; GARCÍA-FRANCO, J. G. Anther and stigma morphology in mirror-image flowers of *Chamaecrista chamaecristoides* (Fabaceae): implications for buzz pollination. **Plant Biology**, [S. l.], v. 13, n. SUPPL. 1, p. 19–24, 2011. DOI: 10.1111/j.1438-8677.2010.00324.x. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1438-8677.2010.00324.x>.
- ARMBRUSTER, W. S.; HANSEN, T. F.; PÉLABON, C.; PÉREZ-BARRALES, R.; MAAD, J. The adaptive accuracy of flowers: Measurement and microevolutionary patterns. **Annals of Botany**, [S. l.], v. 103, n. 9, p. 1529–1545, 2009. DOI: 10.1093/aob/mcp095.
- ARMBRUSTER, W. S.; BOLSTAD, G. H.; HANSEN, T. F.; KELLER, B.; CONTI, E.; PÉLABON, C. The measure and mismeasure of reciprocity in heterostylous flowers. **New Phytologist**, [S. l.], v. 215, n. 2, p. 906–917, 2017. DOI: 10.1111/nph.14604. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/nph.14604>.
- BAHADUR, B.; CHATURVEDI, A.; SWAMY, N. R. SEM studies of pollen in relation to

- enantiostyly and heteranthery in Cassia (Caesalpinaceae). **Journal of Palynology**, [S. l.], v. 91, p. 7–22, 1990.
- BARRETT, S. C. H.; JESSON, L. K.; BAKER, A. M. The Evolution and Function of Styly Polymorphisms in Flowering Plants. **Annals of Botany**, v. 85, p. 253–265, 2000.
- BARRETT, S. C. H. The evolution of plant sexual diversity. **Nature Reviews Genetics**, [S. l.], v. 3, n. 4, p. 274–284, 2002. DOI: 10.1038/nrg776. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nrg776>.
- BARRETT, S. C. H.; SHORE, J. S. New Insights on Heterostyly: Comparative Biology, Ecology and Genetics. In: **Self-Incompatibility in Flowering Plants**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2008. p. 3–32. DOI: 10.1007/978-3-540-68486-2_1. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-68486-2_1.
- BARROS, M. A. G. e. Biologia reprodutiva e polinização de espécies simpátricas de *Diplusodon* (Lythraceae). **Acta Botanica Mexicana**, [S. l.], n. 37, p. 11–21, 1996. DOI: 10.21829/abm37.1996.765.
- BUCHMANN, S. L. Buzz pollination in angiosperms. In: JONES, C. E.; LITTLE, R. .. (org.). **Handbook of experimental pollination biology**. New York: Van Nostrand Reinhold Company, 1983. p. 73–113.
- CARVALHO, D. A.; OLIVEIRA, P. E. Biologia reprodutiva e polinização de *Senna sylvestris* (Vell.) H.S. Irwin & Barneby (Leguminosae, Caesalpinioideae). **Revista Brasileira de Botânica**, [S. l.], v. 26, n. 3, p. 319–328, 2003. DOI: 10.1590/s0100-84042003000300005.
- DULBERGER, R. The floral biology of *Cassia didymobotrya* and *C. auriculata* (Caesalpinaceae). **American Journal of Botany**, [S. l.], v. 68, n. 10, p. 1350–1360, 1981. DOI: 10.1002/j.1537-2197.1981.tb07846.x. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/j.1537-2197.1981.tb07846.x>.
- JESSON, L. K. **The evolution and functional significance of enantiostyly in flowering plants**. 2002. University of Toronto, [S. l.], 2002.
- 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**, [S. l.], v. 89, n. 2, p. 253–262, 2002. a. DOI: 10.3732/ajb.89.2.253.
- JESSON, L. K.; BARRETT, S. C. H. Solving the puzzle of mirror-image flowers. **Nature**, [S. l.], v. 417, n. 6890, p. 707–707, 2002. b. DOI: 10.1038/417707a. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/417707a>.
- JESSON, L. K.; BARRETT, S. C. H. The Comparative Biology of Mirror - Image Flowers. **International Journal of Plant Sciences**, [S. l.], v. 164, n. 5, p. 237–249, 2003.
- JESSON, L. K.; BARRETT, S. C. H. Experimental tests of the function of mirror-image flowers. **Biological Journal of the Linnean Society**, [S. l.], v. 85, n. 2, p. 167–179, 2005. DOI: 10.1111/j.1095-8312.2005.00480.x. Disponível em: <https://academic.oup.com/biolinnean/article-lookup/doi/10.1111/j.1095-8312.2005.00480.x>.
- JESSON, L. K.; KANG, J.; WAGNER, S. L.; BARRETT, S. C. H.; DENGLER, N. G. The development of enantiostyly. **American Journal of Botany**, [S. l.], v. 90, n. 2, p. 183–195, 2003. DOI: 10.3732/ajb.90.2.183.
- LAPORTA, C. Floral biology and reproductive system of enantiostylous *Senna corymbosa* (Caesalpinaceae). **Revista de Biologia Tropical**, [S. l.], v. 53, n. 1–2, p. 49–61, 2005. DOI: 10.15517/rbt.v53i1-2.14361.

LEWIS, G. P.; IRWIN, H. S.; BARNEBY, R. C. The American Cassiinae: A Synoptical Revision of Leguminosae Tribe Cassieae Subtribe Cassiinae in the New World. **Kew Bulletin**, [S. l.], v. 39, n. 3, p. 664, 1984. DOI: 10.2307/4108613. Disponível em: <http://www.jstor.org/stable/4108613>.

MARAZZI, B.; SANDERSON, M. J. Large-scale patterns of diversification in the widespread legume genus senna and the evolutionary role of extrafloral nectaries. **Evolution**, [S. l.], v. 64, n. 12, p. 3570–3592, 2010. DOI: 10.1111/j.1558-5646.2010.01086.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1558-5646.2010.01086.x>.

MATIAS, R.; PÉREZ-BARRALES, R.; CONSOLARO, H. Patterns of variation in distylous traits and reproductive consequences in *Erythroxylum* species and populations. **American Journal of Botany**, [S. l.], v. 107, n. 6, p. 910–922, 2020. DOI: 10.1002/ajb2.1478. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ajb2.1478>.

MORAIS, J. M.; CONSOLARO, H. N.; BERGAMINI, L. L.; FERRERO, V. Patterns of pollen flow in monomorphic enantiostylous species: the importance of floral morphology and pollinators' size. **Plant Systematics and Evolution**, [S. l.], v. 306, n. 2, p. 22, 2020. DOI: 10.1007/s00606-020-01627-1. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00606-020-01627-1>.

MÜLLER, F. Two Kinds of Stamens with Different Functions in the Same Flower. **Nature**, [S. l.], v. 27, n. 694, p. 364–365, 1883. DOI: 10.1038/027364b0.

PINHEIRO, M.; SAZIMA, M. Visitantes florais e polinizadores de seis espécies arbóreas de Leguminosae melitófilas na Mata Atlântica no Sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, [S. l.], v. 5, p. 447–449, 2007.

RICHARDS, J.H.; KOPTUR, S. Floral variation and distily in *Guettarda scabra* L. (Rubiaceae). **American Journal of Botany**, [S. l.], v. 80, p. 31–43, 1993.

VALLEJO-MARÍN, M. Buzz pollination: studying bee vibrations on flowers. **New Phytologist**, [S. l.], v. 224, n. 3, p. 1068–1074, 2019. DOI: 10.1111/nph.15666. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/nph.15666>.

VOGEL, S. Evolutionary shifts from reward to deception in pollen flowers. In: RICHARDS, A. J. (org.). **The Pollination of Flowers by Insects**. London: Academic Press, 1978. p. 89–96. Disponível em: <http://ci.nii.ac.jp/naid/10011264636/en/>.

WESTERKAMP, C. Ricochet pollination in Cassias—and how bees explain enantiostyly. In: **Solitary bees: conservation, rearing and management for pollination**. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2004. p. 225–230.

WOLOWSKI, M.; FREITAS, L. Sistema reprodutivo e polinização de *Senna multijuga* (Fabaceae) em Mata Atlântica Montana. **Rodriguésia**, [S. l.], v. 61, n. 2, p. 167–179, 2010. DOI: 10.1590/2175-7860201061202. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2175-78602010000200167&lng=pt&tlng=pt.

CAPÍTULO 1:**Morfofuncionalidade de estiletos em flores enantiosísticas monomórficas de
Senna rugosa (Fabaceae-Caesalpinioideae)**

Morfofuncionalidade de estiletos em flores enantiostílicas monomórficas de *Senna rugosa* (Fabaceae-Caesalpinioideae)

Artigo Original

Bruna Letícia Pereira Braga¹; Raphael Matias ²; Hélder Nagai Consolaro³; Jefferson Thiago Souza⁴; Natan Messias Almeida ^{1,5}

^{1*} Programa de Pós Graduação em Botânica. Universidade Federal Rural do Pernambuco.

Avenida Dom Manuel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE, Brasil, 52171900.

² Instituto Federal de Goiás, Campus Águas Lindas, R. 21, Jardim Querência, Águas Lindas de Goiás, GO, 72910733.

³ Universidade Federal de Catalão, Instituto de Biotecnologia, Departamento de Ciências Biológicas. Avenida Doutor Lamartine Pinto de Avelar, Loteamento Vila Chaud, Catalão, GO, Brasil, 75704020.

⁴ Universidade Estadual do Ceará. Faculdade de Educação Ciências e Letras de Iguatu, Campus Multi-institucional Humberto Teixeira, Avenida Dário Rabelo, s/n, Santo Antônio, Iguatu, CE, Brasil, 63502253.

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

Running title: Inaccuracy and morpho-functionality of styles of *Senna rugosa*

*Corresponding author: B. L. P. Braga (brunaleticiapb@gmail.com)

RESUMO

Antecedentes e objetivos: A enantiostilia evoluiu de pressões capazes de reduzir a autogamia e geitonogamia e promover a polinização cruzada, mas, devido à ocorrência de ambos os morfos no mesmo indivíduo, espécies monomórficas contradiriam parcialmente o significado evolutivo da enantiostilia. Nosso objetivo é avaliar a reciprocidade intra e intermorfo e confrontar padrões morfofuncionais dos morfos direitos e esquerdos.

Métodos: Estudamos *Senna rugosa*, uma espécie enantiostílica monomórfica polinizada por vibração. Descrevemos a variação na posição dos órgãos sexuais e usamos a abordagem de inacurácia adaptativa para inferir a reciprocidade intra e intermorfo nas estruturas reprodutivas. Verificamos as proporções de diferentes tipos florais baseados em critérios morfofuncionais. Também analisamos a guilda de visitantes florais, o sistema de compatibilidade e a viabilidade polínica.

Resultados Chave: Os padrões de reciprocidade de flores com estigmas direitos e esquerdos dentro das combinações intra e intermorfo não foram simétricos. Em flores direitas, a hercogamia entre estigmas e anteras de polinização distantes do estilete é gerada principalmente pelo afastamento horizontal, enquanto a profundidade é a medida que gera maior hercogamia com anteras de polinização próximas ao estilete. Nas flores esquerdas, a hercogamia foi gerada principalmente pelo afastamento horizontal, independente da antera considerada. Os indivíduos exibiram proporção semelhante dos tipos florais considerando o critério morfológico, porém, considerando a morfofuncionalidade, a proporção de flores diferiu, com menor proporção de flores funcionalmente esquerdas. *Senna rugosa* foi visitada por sete espécies de abelhas, apresentou um certo grau de autocompatibilidade e os grãos de pólen apresentaram alta viabilidade.

Conclusões: *Senna rugosa* configura o primeiro relato de uma possível divisão de funções na captação do pólen entre flores de morfos opostos, evidenciando variações nos padrões morfofuncionais das flores que podem estar ligados às pressões seletivas como segurança reprodutiva e aumento da aptidão na captura de pólen por estiletes em posições específicas.

Palavras-chave: Reciprocidade floral; hercogamia recíproca; enantiostilia; polinização por vibração.

INTRODUÇÃO

A maioria das flores das Angiospermas apresenta algum tipo de separação espacial entre anteras e estigmas que pode diminuir as chances de autopolinização (Lloyd e Webb, 1986; Webb e Lloyd, 1986). Tal separação, denominada hercogamia, é chamada hercogamia homomórfica quando todos os indivíduos de uma espécie apresentam a mesma disposição dos verticilos reprodutivos e hercogamia recíproca quando a altura das anteras das flores de um indivíduo corresponde à posição do estigma das flores do indivíduo de morfo oposto (Webb e Lloyd, 1986). A enantioestilia é um dos polimorfismos florais que possui a hercogamia recíproca, no qual o pistilo está posicionado à esquerda (morfo esquerdo) ou à direita (morfo direito) do centro floral. De maneira contrária, o morfo esquerdo apresenta estames localizados à direita do pistilo, enquanto o morfo direito possui estames a esquerda, o que acaba gerando uma correspondência estrutural entre a antera de um morfo com o estigma do morfo oposto (Barrett, 2002). Espécies enantioestílicas podem ser encontradas nas formas monomórfica e dimórfica. Espécies monomórficas possuem morfos direitos e esquerdos no mesmo indivíduo e espécies dimórficas apresentam apenas um dos morfos florais em cada indivíduo (Barrett, 2002).

A enantioestilia é relatada em, aproximadamente, 11 famílias de Angiospermas que apresentam ampla distribuição geográfica (*sensu* APG IV, 2016), sendo a forma monomórfica a mais comum (Jesson *et al.*, 2003). Dentro da subtribo Cassiinae (Fabaceae-Caesalpinioideae), o gênero *Senna* abriga espécies caracterizadas pela enantioestilia monomórfica, heteranteria (presença de anteras heteromorfas de deiscência poricida, estames de tamanho e funções diferentes, divididos em estames de alimentação e polinização; Almeida *et al.*, 2013a) e “buzz pollination” como modo de polinização (Buchmann, 1983; Carvalho e Oliveira, 2003; Vallejo-Marín, 2019). Nessas flores ainda uma das cinco pétalas (pétala curvada) da flor também participa do processo de polinização (Westerkamp, 2004; Almeida *et al.*, 2013a,b; Almeida *et al.*, 2015b; Amorim *et al.*, 2017). A partir da vibração das abelhas, o pólen é lançado contra a

pétala curvada que direciona os grãos de pólen para locais distintos do corpo dos eventuais polinizadores (Westerkamp, 2004; Jesson e Barrett, 2005; Almeida *et al.*, 2013a,b; Almeida *et al.*, 2015b; Amorim *et al.*, 2017). Nestas espécies, o ponto de inserção do pistilo no receptáculo é contrário ao da pétala, porém o estilete pode apresentar uma curvatura que o coloca no mesmo lado da pétala em relação ao centro floral (Almeida e Castro, 2019). Sendo assim, é possível que a pétala possa ser utilizada como um indicativo morfológico do morfotipo floral (direito ou esquerdo), porém, com uma funcionalidade contrária (aspecto morfofuncional especular).

Estudos com espécies de *Senna* mostram variações no sistema de polinização, principalmente vinculados a oscilações na apresentação dos verticilos florais que, conseqüentemente, podem afetar os níveis de reciprocidade e funcionalidade da enantioestilia (Gostberger e Silberbauer-Gottsberger, 1988; Carvalho e Oliveira, 2003; Westerkamp, 2004; Marazzi *et al.*, 2007; Almeida *et al.*, 2015a,b). Neste sentido, estudos evidenciam uma produção desigual de morfos direitos e esquerdos entre os indivíduos de espécies monomórficas, na qual um indivíduo pode tornar-se funcionalmente direito ou esquerdo, contudo a proporção dos morfos florais se mantém semelhante na população (isopleτία), possibilitando a redução nas taxas de geitonogamia neste tipo enantioestílico (Almeida *et al.*, 2013b; ALMEIDA *et al.*, 2018). Investigar as variações nos níveis de reciprocidade e os diferentes posicionamentos dos verticilos envolvidos na polinização é um passo inicial para entender os processos ecológicos vinculados à seleção das características morfológicas de espécies enantioestílicas.

Avaliar a reciprocidade na enantioestilia não é uma tarefa fácil, pois a literatura carece de metodologias aplicadas ao polimorfismo. Para espécies de Cassiinae, a avaliação da correspondência é agravada, pois é necessário levar em consideração não só a lateralidade dos órgãos sexuais em relação ao eixo floral, mas também a angulação, a profundidade e o posicionamento vertical (altura). Na heterostilia, um polimorfismo floral mais estudado, a reciprocidade é calculada através de modelos matemáticos baseados na imprecisão adaptativa, nas quais é possível avaliar o *fitness* (Armbruster *et al.*, 2017; Matias *et al.*, 2020). Até o

momento, não foram encontradas aplicações específicas da imprecisão adaptativa aos estudos de reciprocidade na enantioestilia, muito embora Armbruster *et al.* (2017) e Almeida e Castro (2019) tenham sugerido que é possível a aplicação de tal método.

Hipóteses relacionadas à evolução mostram que espécies enantioestílicas monomórficas sofrem pressões seletivas que podem levar o aumento da xenogamia e redução da autogamia e geitonogamia (Jesson e Barrett, 2002, 2003, 2005) e, por isso, têm apresentado diferentes estratégias para a garantia do sucesso reprodutivo, sobretudo dentro da subtribo Cassiinae (Almeida *et al.*, 2013a, b; Almeida *et al.*, 2015a,b; Almeida *et al.*, 2016, 2018). Desvios no padrão hercogâmico recíproco encontrados em flores enantioestílicas podem resultar em novas estratégias reprodutivas capazes de conferir maior aptidão às espécies. Em *Chamaecrista flexuosa* (Fabaceae), foi descrito um padrão atípico de funcionalidade dos morfos florais dentro da subtribo Cassiinae, de modo que divergências entre morfologia e funcionalidade geraram um morfo funcionalmente central, que facilitaria a transferência polínica entre órgãos reprodutivos e aumentaria o fitness reprodutivo da espécie (Almeida *et al.*, 2013b). Nesse sentido, vemos a necessidade de investigar dentro da subtribo Cassiinae novos padrões da enantioestilia a fim de compreender quais pressões seletivas estão atuando na forma e função dos morfos florais e quais estratégias estão garantindo o sucesso reprodutivo dentro desses grupos, seja pela polinização cruzada, corroborando o significado evolutivo da enantioestilia, ou pela autopolinização, reforçando a hipótese da segurança reprodutiva (Schoen *et al.*, 1996).

Este estudo objetiva responder as seguintes perguntas, tendo como modelo *Senna rugosa* (G. Don) H. S. Irwin e Barneby: 1) Qual o nível de reciprocidade entre anteras de polinização e estigmas intra e intermorfo de *S. rugosa*? 2) Quais parâmetros (altura, profundidade ou horizontalidade) conduzem a hercogamia nas flores de *S. rugosa*? 3) Qual a razão dos morfos (isopletia) a partir do posicionamento da pétala e sob o aspecto morfofuncional (posicionamento do estigma)? Nesse sentido, buscamos testar as seguintes

hipóteses: 1) A reciprocidade intramorfo de anteras e estigmas é menor do que a intermorfo; 2) A hercogamia ocorre pelo afastamento horizontal das estruturas reprodutivas em ambos os morfos 3) Quando classificadas sob o aspecto morfológico, os morfos apresentam proporção semelhante de flores (isopletia), mas na avaliação morfofuncional a proporção de morfos florais é irregular (ausência de isopletia). Juntamente a isso, descrevemos os visitantes florais, sistema de acasalamento e viabilidade polínica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Área de estudo

O estudo foi realizado no período de março de 2019 a agosto de 2020 na Floresta Nacional do Araripe (FLONA Araripe), localizada no topo da Chapada do Araripe, extremo Sul do Ceará, Brasil. A área apresenta relevo tabular com altitude variando de 700 a 920 metros e área de 38.262 hectares, predominando o tipo de solo latossolo (Alves *et al.*, 2011). A FLONA Araripe possui coordenadas geográficas 38°30' a 40° 55' Oeste e de 7° 07' a 7° 49' Sul. O clima é tropical quente com média pluviométrica de 1.000 mm anuais e temperatura variando de 15 a 25°C. O tipo de vegetação é subperenifólia de matas úmidas, apresentando no sentido norte sul, transição entre os tipos vegetacionais *sensu strictu* cerrado, cerradão e carrasco (Azevedo *et al.*, 2011).

Espécie do estudo

A pesquisa foi realizada com *S. rugosa*, pertencente à subtribo Cassiinae (Fabaceae-Caesalpinioideae). A espécie já foi registrada na Bolívia, no Paraguai e no Brasil. No Brasil, sua ocorrência se estende do Norte ao Sul do país, com maior abundância em áreas de Cerrado do Brasil Central (Dantas e Silva, 2013; Irwin e Barneby, 1982). *Senna rugosa* é uma planta

arbustiva com flores de coloração amarela, zigomorfas e antese diurna. Apresenta enantiostilia monomórfica e anteras com deiscência poricida. As flores oferecem apenas pólen como recurso e são visitadas, exclusivamente, por abelhas fêmeas que realizam a polinização através de processo denominado “buzz pollination” ou polinização por vibração (Buchmann, 1983; Carvalho e, Oliveira 2003; Vallejo-Marín, 2019). Cada flor possui dois grupos de estames heteromórficos férteis, sendo um conjunto formado por três grandes estames com função de polinização (12-15mm de comprimento) e o outro conjunto formando por quatro estames menores centrais com função de alimentação (7,4-9mm de comprimento); além disso, as flores possuem três estaminódios adaxiais (3-3,5mm de comprimento; ver Gosttberger e Silberbauer-Gottsberger, 1988; Azevedo e Conceição, 2017). Os grãos de pólen das anteras de alimentação são depositados na porção ventral do polinizador e os grãos de pólen das anteras de polinização na região dorsal (Almeida *et al.*, 2015b). A floração de *S. rugosa* ocorre nos meses de março, abril e junho, e a frutificação nos meses de abril e junho (Costa; Araújo; Lima-Verde, 2004; Batalha e Martins, 2004).

Caracterização morfológica das flores e variação na posição dos órgãos sexuais

A partir de fotografias em visão frontal, classificamos flores (n=176) de 29 indivíduos de *S. rugosa* em tipos florais direito e esquerdo tomando como referência o posicionamento da pétala curvada em relação ao eixo floral (Figura 1; Almeida *et al.*, 2013b). Quando a pétala estava posicionada à direita do eixo floral, a flor foi considerada esquerda e o inverso para a classificação direita (Figura 1; Almeida *et al.*, 2013b). Utilizar a pétala curvada para classificar o tipo floral é usual em estudos com espécies enantiostílicas de Cassiinae, pois a posição dela oposta ao estilete ocorre como um padrão no grupo (Westerkamp, 2004; Marazzi e Endress, 2008; Almeida *et al.*, 2013a, b; Almeida *et al.*, 2015a, b; Amorim *et al.*, 2017). Para avaliar se as proporções das flores direitas e esquerdas estavam balanceadas dentro dos

indivíduos da população estudada (isoplelia), um modelo linear generalizado (GLM) foi implementado usando a função “glm” no pacote “lme4” do R (Bates *et al.* 2018). O tipo floral morfológico foi incluído no modelo como fator fixo e a proporção de flores por planta individual foi modelada com uma distribuição binomial e uma função “logit”. A significância foi testada com a análise de variância Tipo-II (pacote “car”; Fox e Weisberg, 2018). Todas as análises deste estudo foram realizadas no ambiente estatístico R (R Development Core Team, 2020).

Após a classificação dos tipos florais quanto à posição das pétalas, o posicionamento dos estigmas e das anteras foram obtidos através de fotografias padronizadas das mesmas flores recém abertas no campo. As fotografias foram tiradas em visão frontal e superior de flores direitas (n=92) e esquerdas (n=84) de 29 indivíduos da espécie (Figura 1). As anteras de polinização foram denominadas PA1, PA2 e PA3, de acordo com o tipo floral, de maneira que em flores direitas a classificação ocorreu em ordem crescente, da esquerda para a direita, e em flores esquerdas classificou-se de forma contrária (Figura 1). Tal numeração foi necessária para identificar a PA3 como a antera mais próxima ao estilete e as anteras PA1 e PA2 como as anteras opostas ao posicionamento do estilete, dentro de cada tipo floral. O número de flores analisadas por planta foi variado, visto que alguns indivíduos tinham número reduzido de flores disponíveis (por ex. 3 flores), enquanto outros tinham um número maior de flores (por ex. 17 flores). As flores foram fotografadas e as seguintes medidas foram mensuradas, tomando como referência o eixo floral: 1) afastamento horizontal; 2) altura; 3) profundidade; 4) angulação do estigma e das três anteras de polinização de cada flor (Figura 2). As medidas 1, 2 e 3 foram tomadas em mm e a angulação em graus (°) utilizando o Software “Image J” (Rasband, 1997).

A variação na posição dos estigmas e das três anteras de polinização nas flores direitas e esquerdas foi visualizada por meio de gráficos de dispersão tridimensionais. Para isso, as medidas de afastamento horizontal, altura e profundidade foram plotadas usando o pacote

“scatterplot3d” no R (Ligges e Maechler, 2003), representando cada estigma e antera como um único ponto em um espaço tridimensional. Gráficos de dados circulares também foram usados para analisar visualmente a distribuição dos dados de angulação, considerando a profundidade como uma medida de densidade, geralmente aplicada na análise de dados circulares (Jammalamadaka e SenGupta, 2001). Para produzir os gráficos foi utilizado o pacote “plotrix” no R (Lemon *et al.*, 2020).

Hercogamia recíproca

Para investigar a reciprocidade de cada antera de polinização com estigmas intra e entre morfos, foi usada a abordagem de inacurácia adaptativa (sensu Armbruster *et al.*, 2017). Até o momento, o índice de imprecisão foi calculado apenas em espécies distílicas e tem como objetivo medir o grau de correspondência entre as partes férteis do sexo oposto em tipos florais complementares, refletindo a correspondência de localizações de deposição de pólen e contato de estigma com polinizadores (Armbruster *et al.*, 2017; Jacquemyn *et al.*, 2018; Matias *et al.*, 2020; Furtado *et al.*, 2021). No entanto, o índice de imprecisão não se restringe a espécies distílicas e pode ser usado sempre que houver variação nos traços morfológicos, fisiológicos ou comportamentais (Armbruster *et al.*, 2017). Este estudo é o primeiro a usar a abordagem da inacurácia adaptativa para inferir a reciprocidade dos órgãos sexuais em espécies enantioestílicas. O índice de inacurácia analisa como as populações se afastam do ótimo e como a variação da média dessas populações (conhecida por imprecisão) contribui para a inacurácia na transferência de pólen e no cenário fenotípico final (Armbruster *et al.*, 2017). O índice de inacurácia foi calculado para *S. rugosa* considerando todas as combinações de pares envolvendo estigmas e anteras de polinização. As combinações são classificadas em dois grupos: inter e intramorfo. Para calcular a imprecisão, a média e a variância de cada órgão sexual dentro da população estudada foram usadas [inacurácia = (média das anteras + média dos estigmas)² +

variância de anteras + variância de estigmas] (ver Armbruster *et al.*, 2017 para mais detalhes). As medidas de afastamento horizontal, altura e profundidade dos órgãos sexuais (todas em unidades de mm) foram analisadas independentemente e, em seguida, os três resultados de imprecisão dentro da mesma combinação de órgãos sexuais foram somados para fornecer um valor de inacurácia total. Os dados de angulação não foram usados para calcular a imprecisão (apenas para inspeção visual; veja acima), uma vez que a unidade de medida é diferente das outras formas de medida. A unidade de imprecisão são as unidades de traço ao quadrado, e quanto mais próximo de zero o valor obtido, menor a imprecisão e maior a reciprocidade dos órgãos sexuais (Armbruster *et al.*, 2017).

Avaliação morfofuncional dos tipos florais

A partir de observações prévias nas flores de *S. rugosa*, percebemos que, apesar dos estiletos emergirem do lado direito ou esquerdo do centro da flor, eles se curvam e podem alcançar outros posicionamentos. Nesse sentido, flores direitas apresentam uma curvatura no estilete que, em alguns casos, faz com que os estigmas se posicionem no centro floral ou à esquerda da flor (assim como em flores esquerdas ocorreu o oposto). Diante disso, além da classificação morfológica, as flores foram avaliadas segundo o seu papel perante ao fluxo de pólen (morfofuncional).

A avaliação morfofuncional dos tipos florais morfológicos foi feita analisando a medida de afastamento horizontal obtida entre o estigma e o eixo da flor (n= 176 flores distribuídas em 29 indivíduos). Dessa forma, considerando a ampla faixa de deposição de pólen no corpo do polinizador, flores com estigmas posicionados à esquerda do centro floral obtiveram distâncias negativas menores do que -1mm, sendo consideradas funcionalmente esquerdas. Flores que apresentaram estigmas com valores positivos, acima de 1mm, foram considerados funcionalmente direitas. Flores foram classificadas funcionalmente centrais

quando os estigmas se alinham ao seu eixo, com valores entre -1mm e 1mm (Almeida *et al.*, 2013b).

Para avaliar se os tipos florais funcionais (estilo direito, central e esquerdo) estavam equilibrados dentro dos indivíduos estudados (isoplezia), um GLM foi implementado usando a função "glm" no pacote "lme4" (Bates *et al.*, 2018). O tipo floral funcional foi incluído como fator fixo e a proporção de flores por indivíduo foi modelada com uma distribuição binomial e uma função "logit". A significância foi testada com a análise de variância do Tipo II, conforme descrito acima. Um teste *post hoc* foi usado para investigar as diferenças entre os tipos florais funcionais usando a função "lsmeans" com um ajuste de Tukey do pacote "emmeans" (Lenth *et al.*, 2019).

Posteriormente, foi analisada a mudança de funcionalidade nas flores morfológicamente direita e esquerda. 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 um GLM com proporção de flores como variável resposta. A significância da variável preditora foi testada com a análise de variância do Tipo II e o teste *post hoc* foi conduzido conforme descrito acima.

Visitantes florais, sistema de acasalamento e viabilidade polínica

Foram realizadas observações da guilda de visitantes florais em 30 indivíduos de *S. rugosa* no período das 8:00h às 11:00h da manhã e das 14:00h às 17:00h da tarde, totalizando 131 horas de observação. Durante as observações, foram registrados o número de visitas, a identidade e o comportamento dos visitantes, sendo considerado polinização quando os insetos tocavam simultaneamente anteras e estigmas e pilhagem quando apenas as anteras eram contactadas para coleta do recurso. Sempre que possível, os visitantes foram capturados com rede entomológica para posterior identificação.

Ao final do período de observação focal, 60 flores foram ensacadas nos 30 indivíduos (duas flores por indivíduo) para acompanhar a formação de frutos por polinização natural. Além disso, para avaliar o sistema de compatibilidade, foram realizadas polinizações manuais controladas. Para isso, foram ensacados 120 botões florais em pré-antese, em um total de 30 indivíduos (n= quatro; botões por indivíduo). Os botões foram isolados em sacos de voil e no período de antese foram realizados os tratamentos de autopolinização manual (n=60 flores) e autopolinização espontânea (n=60 flores). Na autopolinização manual, os grãos de pólen foram transferidos das anteras de polinização ao estigma da própria flor com o auxílio de um palito de madeira. Na autopolinização espontânea, as flores permaneceram ensacadas durante todo o período de antese, sem nenhuma manipulação. A frutificação foi avaliada após duas semanas.

A viabilidade polínica foi estimada pelo método indireto de coloração citoplasmática com carmim acético (Dafni, 1992). Para realizar este teste, 20 botões florais foram coletados de dez indivíduos (dois botões florais por indivíduo, sendo um botão de cada morfo floral) e armazenados em álcool 70%. Em laboratório, as anteras de cada botão floral foram separadas pela sua funcionalidade (alimentação ou polinização), dissecadas e maceradas separadamente sobre lâminas de vidros. Sob microscopia de luz, foram contabilizados os 200 primeiros grãos de pólen de cada antera, os quais foram classificados em grãos viáveis (profundamente manchado e esférico) e não viáveis (vazio e amorfo; Dafni, 1992; Wolowski e Freitas, 2010). A porcentagem de viabilidade polínica por antera foi estimada como: n° total de grãos de pólen viáveis / n° total de grãos de pólen examinados \times 100.

RESULTADOS

Caracterização morfológica das flores e variação na posição dos órgãos sexuais

Os indivíduos da população estudada apresentaram proporções significativamente similares de flores direitas e esquerdas ($\chi^2 = 0.012$; d.f. = 1; $p = 0.912$; Fig. 3a). Observamos variações na posição dos órgãos sexuais nos tipos florais de *Senna rugosa* (Fig. 4 e 5). O estigma foi o órgão que apresentou maior variação nos tipos florais (Fig. 4 e 5), o que levou a um *continuum* em seu posicionamento. Esta variação do estigma ocorreu principalmente pelo afastamento horizontal e profundidade (Fig. 6; Tabela 2), embora grande variação também tenha sido registrada na medida de angulação ($>$ de 90° em ambos os tipos florais; Fig. 5). Estigmas de flores esquerdas possuem maior variação do que estigmas de flores direitas considerando medidas de afastamento horizontal, altura e profundidade, com destaque para o afastamento horizontal (Fig. 4; Tabela 2).

Hercogamia recíproca

Valores totais de inacurácia variaram de 5.92 a 12.88 (ver detalhes na Tabela 3). Dentre as combinações consideradas (intra e intermorfo), estigmas de flores esquerdas tiveram menor inacurácia total com anteras PA1 direitas (inacurácia de 6.13), indicando maior reciprocidade entre órgãos sexuais dentro de uma combinação intermorfo. Entretanto, estigmas de flores direitas tiveram menor inacurácia total com anteras PA3 direitas (combinação intramorfo; inacurácia de 5.92). Levando em consideração a reciprocidade intermorfo, estigmas esquerdos possuem maior reciprocidade do que os direitos. Em ambos os tipos florais, as anteras PA1 foram as mais recíprocas (Fig. 4A, B e 5). Estigmas de flores esquerdas tiveram inacurácia total de 6.13 com anteras PA1 direitas e 7.58 com PA2, enquanto estigmas de flores direitas obtiveram valores de inacurácia total de 6.36 com anteras PA1 esquerdas e 6.97 com PA2.

A hercogamia intramorfo entre estigmas e anteras PA1 e PA2 de flores direitas é gerada principalmente pelo afastamento horizontal (Fig. 4C e D, Tabela 2), sendo esta medida a principal contribuinte para a inacurácia total destes órgãos (contribuição de 62.25% e 38.80%,

considerando PA1 e PA2 respectivamente; Tabela 3). Contudo, estigmas e anteras PA3 de flores direitas possuem menor hercogamia de afastamento horizontal (Tabela 2), sendo a profundidade a principal medida que contribuiu para a inacurácia total (42.91%; Fig. 5, Tabela 3) e separação entre os órgãos. Combinações intramorfo dentro de flores esquerdas indicaram que a inacurácia total é gerada, principalmente, pelo afastamento horizontal, independente da antera considerada (Tabela 3).

Avaliação morfofuncional dos tipos florais

Considerando a morfofuncionalidade do tipo floral a partir do posicionamento do estigma (direito, central e esquerdo), a proporção de flores diferiu significativamente ($\chi^2=11.446$; d.f.= 2; $p=0.003$; Fig. 3b). Os indivíduos de *S. rugosa* apresentaram menor proporção de flores funcionalmente esquerdas do que direitas ($p=0.008$) e centrais ($p=0.011$). No entanto, não houve diferença significativa na proporção dos dois últimos tipos ($p=0.993$).

Baseado na caracterização morfológica, os tipos florais variaram significativamente quanto à sua funcionalidade ($\chi^2=85.082$; d.f.=5; $p<0.001$; Fig. 3c) em decorrência da variação na curvatura do estilete, o que conseqüentemente afeta a posição do estigma. Flores esquerdas frequentemente mudam sua funcionalidade para central, enquanto não houve diferença significativa entre a proporção de flores com estilete desviados para a esquerda e para o centro floral ($p=0.999$; Fig. 3c). Flores esquerdas com funcionalidade à direita ocorreram em menor proporção ($p<0.018$; Figura 3c). Já as flores direitas eram mais funcionalmente direitas, do que centrais ($p=0.023$) e esquerdas ($p<0.001$; Fig. 3c). Estes dois últimos tipos funcionais também apresentaram diferenças significativas, com maior proporção de flores direitas sendo funcionalmente centrais do que esquerdas ($p<0.001$; Fig. 3c). Não houve diferença significativa entre tipos florais mudando completamente sua funcionalidade, ou seja, flores direitas que são

funcionalmente esquerdas e flores esquerdas que são funcionalmente direitas (Fig. 3c; $p=0.109$).

Visitantes florais, sistema de acasalamento e viabilidade polínica

Senna rugosa foi visitada por sete espécies de abelhas. O número total de visitas de cada espécie de abelha variou de sete a 547 visitas em 131 horas de observação (Tabela 1). Entre as abelhas que visitaram as flores, apenas *Xylocopa* sp. atuou como polinizadora, sendo responsável por apenas 2,74% das visitas (Tabela 1). As outras abelhas atuaram como pilhadoras. A frutificação após autopolinização manual e autopolinização espontânea foi de 35,70% e 17,90%, respectivamente. Em condições naturais, a frutificação foi de 63,00%. As anteras de alimentação e polinização mostraram alta viabilidade polínica. As anteras polinizadoras apresentaram $94,70 \pm 0,47\%$ (média \pm desvio padrão; $n = 53$ anteras) de grãos viáveis e as anteras alimentadoras $96,70 \pm 0,37\%$ ($n = 75$ anteras).

DISCUSSÃO

Em nosso estudo avaliamos o posicionamento de estruturas reprodutivas e a proporção de morfos florais e a morfofuncionalidade de estigmas das flores, bem como descrevemos a biologia da polinização, sistema de autocompatibilidade e viabilidade polínica de uma espécie enantiostílica monomórfica. Nossos achados sugerem importantes estratégias reprodutivas na espécie do estudo. As hipóteses foram corroboradas em parte, visto que nós hipotetizamos que a reciprocidade intermorfo era maior do que a intramorfo e, no entanto, a reciprocidade variou dentro de cada morfo e entre os morfos florais. A hercogamia entre estigmas e anteras opostas (PA1 e PA2) foi garantida pelo afastamento horizontal em ambos os morfos, mas apenas a PA3 direita e o estigma direito apresentam a hercogamia pelo parâmetro de profundidade. Além disso, observamos que o padrão de um morfo ceder mais funcionalidade

para o morfo oposto ocorreu dentro de poucos indivíduos e existe maior número de estiletos funcionais direitos e centrais, quando comparados a funcionalmente esquerdos. Abaixo, discutiremos os dados aqui mencionados e quais razões biológicas/evolutivas podem estar relacionadas com cada um deles.

Estudos clássicos sobre a evolução da enantioestilia hipotetizam que ela se deu sob a ação de pressões seletivas ao aumento nas taxas de xenogamia e reduções da geitonogamia e autogamia (Jesson e Barrett, 2002, 2003, 2005). Isto ocorre pela obrigatoriedade da transferência de pólen entre os morfos florais recíprocos, devido ao padrão de deposição e captação de pólen nos corpos dos polinizadores (Barrett, 2002; Almeida *et al.*, 2015a). No entanto, a partir dos valores de inacurácia, observamos maior reciprocidade do estigma direito com a PA3 direita (Tabela 1). Estes dados sugerem maior fluxo polínico intramorfo, o que refuta parte da nossa hipótese de que a reciprocidade intramorfo é reduzida. Além disso podemos notar maior ocorrência das anteras PA1 e PA2 nos intervalos -1 e 1, o que pode favorecer a polinização de estigmas funcionalmente centrais. Tais padrões podem estar garantindo a segurança reprodutiva da espécie, visto que a espécie é autocompatível, apresenta alta viabilidade polínica em ambos os grupos de anteras e o morfo direito parece apresentar maior possibilidade de recepção de pólen do próprio morfo.

A segurança reprodutiva em espécies enantioestílicas monomórficas já foi proposta em estudos anteriores ao nosso (Jesson e Barrett, 2003; Almeida *et al.*, 2013a; Mora-Carrera *et al.*, 2019). Mora-Carrera *et al.* (2019) testaram o potencial invasor de indivíduos dimórficos em populações monomórficas de *Solanum rostratum* sob condições de alta e baixa densidade de polinizadores. Os autores observaram que em cenários de baixo número de polinizadores as taxas de xenogamia e a produção de frutos não diferem entre indivíduos monomórficos e dimórficos. Estes dados mostram que espécies enantioestílicas monomórficas podem apresentar altas taxas de xenogamia em ambientes naturais, além de apresentarem garantias de formação

de frutos mesmo em ambientes com escassez de serviços de polinização, pela presença de morfos recíprocos no mesmo indivíduo.

Por outro lado, a reciprocidade de estigmas direitos com anteras esquerdas e, em maiores valores, estigmas esquerdos e anteras direitas se mostrou presente na população de *Senna rugosa*. Isso corrobora com a nossa hipótese e com o significado evolutivo da enantiostilia (Jesson e Barrett, 2002, 2003, 2005). No entanto, os dados sugerem que estigmas esquerdos possuem maior possibilidade de captação de pólen do morfo oposto, dinâmica essa que favorece a polinização cruzada dentro da espécie. Este é o primeiro relato de uma possível divisão de funções em flores de morfos opostos na enantiostilia, de modo que flores esquerdas apresentam maior possibilidade de capturar pólen intermorfo, enquanto flores direitas receberiam pólen intramorfo em maiores proporções.

As flores de *Senna rugosa* possuem características morfológicas que as enquadram no tipo enantiostílica não recíproca (Jesson e Barrett, 2003), uma vez que, além das anteras opostas ao gineceu (PA1 e PA2), estas flores apresentam uma antera (PA3) no mesmo lado e próxima da estrutura feminina, o que possibilita a deposição de pólen em lados opostos do corpo do polinizador e captação pelo estigma da mesma flor. No entanto, o afastamento horizontal parece garantir a hercogamia em flores de *Senna rugosa*, o que pode reduzir as chances de autopolinização, com exceção dos estigmas direitos que apresentam maior afastamento das PA3 pelo parâmetro de profundidade. Avaliar a reciprocidade na enantiostilia a partir da obtenção de valores de inacurácia propostos por Armbruster *et al.* (2017) é algo inédito, visto que, até o presente momento, cálculos baseados na imprecisão adaptativa têm sido bem aceitos para espécies heterostílicas (Matias *et al.*, 2020; Raupp *et al.*, 2020). Neste sentido, nossos dados indicam a necessidade de uma adaptação de avaliação da reciprocidade na enantiostilia baseada em modelos matemáticos já estabelecidos na literatura, visto a necessidade de compreender como a reciprocidade se comporta em espécies enantiostílicas.

A proporção semelhante de morfos florais direitos e esquerdos tem sido recorrente em espécies enantiostróficas monomórficas da subtribo Cassiinae (Almeida *et al.*, 2013a,b; Almeida *et al.*, 2016; Almeida *et al.*, 2018). No entanto, avaliações tomando como referência a funcionalidade do estilete, de acordo com o seu posicionamento, foram feitas apenas para *Chamaecrista flexuosa* realizado por Almeida *et al.* (2013a). Os autores encontraram menor frequência de estiletos funcionalmente direitos quando comparado a frequência de estiletos centrais e esquerdos na população. Eles sugerem que as variações nos posicionamentos dos estiletos podem estar relacionadas à um aumento na área de captação de pólen no corpo do polinizador. Em nosso estudo, tivemos achados semelhantes, no entanto as funcionalidades do estilete observadas com maior frequência na população foram direita e central. Da mesma forma, entendemos que esta variação no posicionamento, com a presença do estilete funcionalmente central, deve favorecer a captura do pólen em maior área no corpo do polinizador. Apesar da construção da hipótese sobre o aumento da área de captação do pólen, Almeida *et al.* (2013a) não apresentaram explicações para a ocorrência de maior frequência de estiletos para um dos posicionamentos. Nós entendemos que a maior frequência de estiletos funcionalmente direitos e centrais é resultado de pressões seletivas em resposta a um aumento da aptidão reprodutiva de *Senna rugosa*, como explicado a seguir.

Alguns estudos mostram que abelhas dos gêneros *Bombus* e *Xylocopa* (única espécie polinizadora observada em *Senna rugosa*) apresentam lateralização olfativa, de maneira que, durante as visitas, as abelhas possuem preferência pelo lado direito da flor (Anfora *et al.*, 2011; Brito *et al.*, 2020). Esta preferência pode gerar redução da probabilidade de captura do pólen dos estiletos esquerdos, selecionando assim, flores com maiores desvios dos estiletos para a direita. Além disso, apesar da variedade de abelhas visitantes, apenas uma espécie foi considerada polinizadora. Visto a especificidade na polinização de espécies do gênero *Senna*, estudos apontam que abelhas maiores como espécies do gênero *Bombus* e *Xylocopa* conseguem vibrar e contactar os órgãos sexuais das flores de forma eficiente, evidenciando uma relação

entre o tamanho das abelhas e o tamanho da flor, enquanto que há um número expressivo de abelhas pilhadoras pois pelo seu tamanho reduzido não conseguem contactar os estigmas dos morfos florais (Gosttberger e Silberbauer-Gottsberger, 1988; Carvalho e Oliveira, 2003; Pinheiro e Sazima, 2007; Souza *et al.*, 2012). Além disso, a discrepância entre polinizadores e pilhadores pode estar relacionada à segurança reprodutiva, pois, de acordo com a hipótese da segurança reprodutiva, espécies submetidas a condições não ideais como déficit de polinizadores ou perturbações ambientais podem ter na autopolinização uma garantia da formação de frutos e sementes (Schoen *et al.*, 1996).

Apesar de em alguns indivíduos as flores esquerdas mudarem a funcionalidade para a direita, isso não ocorreu na maioria dos indivíduos. No entanto, flores direitas tendem a ser funcionalmente direitas e flores esquerdas tendem a apresentar mais estigmas próximos ao centro floral. Mas, não encontramos diferenças significativas entre estiletos direitos em flores esquerdas e estiletos esquerdos em flores direitas, o que refuta as nossas previsões. Em *Chamaecrista flexuosa*, flores direitas tendem a apresentar maior número de estiletos posicionados à esquerda do que o oposto (Almeida *et al.*, 2013a). Por existirem apenas estes dois relatos e eles apresentarem dados conflitantes é difícil termos alguma explicação sobre as causas e consequências destes achados. No entanto, hipóteses acerca da segurança reprodutiva e aumento das aptidões na captura de pólen em estiletos em posições específicas, devido às preferências de polinizadores, podem nos trazer pistas das pressões seletivas envolvidas nestes processos.

Os dados aqui explicitados contribuem ao entendimento da evolução da enantiostilia monomórfica, visto que foram observadas diferentes estratégias reprodutivas no modelo de estudo que podem garantir a polinização cruzada e de segurança reprodutiva. Essas estratégias auxiliam na compreensão de quais pressões seletivas estão levando a espécie a alcançar o sucesso reprodutivo. Vale ressaltar que a aplicação de avaliações da reciprocidade ainda não utilizadas dentro da enantiostilia pode implicar em novas perspectivas ao estudo da

reciprocidade dentro do grupo. Além disso, nosso estudo foi baseado em dados estáticos de reciprocidade, ou seja, avaliamos apenas o posicionamento das estruturas florais sem os visitantes. Medições realizadas no momento das visitas, a partir de simulações, podem trazer dados mais precisos acerca dos locais de deposição e captação de pólen por flores enantiostílicas.

AGRADECIMENTOS

Nós agradecemos ao Instituto Chico de Mendes de Conservação da Biodiversidade pelo apoio logístico (ICMBio), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida à B.L.P.Braga, e ao apoio logístico e financeiro da Faculdade de Educação, Ciências e Letras de Iguatu (FECLI/UECE) e da Universidade Federal Rural do Pernambuco (UFRPE).

LITERATURA CITADA

- Almeida NM, Bezerra TT, Oliveira CRS, et al. 2015a.** Breeding systems of enantiostylous Cassiinae species (Fabaceae, Caesalpinioideae). *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* **215**: 9–15.
- Almeida NM, Castro CC. 2019.** Enantiostyly in Angiosperms In: Bahadur B, Krishnamurthy K V., Ghose M, Adams SJ, eds. *Asymmetry in Plants*. New York: CRC Press, 319–328.
- Almeida NM, Castro CC, Leite AVL, 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 NM, Castro CC, Leite A V., Novo RR, Machado IC. 2013b.** Floral polymorphism in *Chamaecrista flexuosa* (Fabaceae-Caesalpinioideae): a possible case of atypical enantiostyly? *Annals of Botany* **112**: 1117–1123.
- Almeida NM, Cotarelli VM, Souza DP, et al. 2015b.** Enantiostylous types of Cassiinae species (Fabaceae-Caesalpinioideae) (A Dafni, Ed.). *Plant Biology* **17**: 740–745.
- Almeida NM, Siqueira Filho JA, Oliveira PE, Novo RR, Castro CC. 2016.** Bicarpeolate gynoecium in two species of *Senna* (Fabaceae, Caesalpinioideae, Cassiinae). *Acta Botanica Brasilica* **30**: 326–328.
- Almeida NM, Souza JT, Oliveira CRS, et al. 2018.** Functional dimorphic enantiostyly in monomorphic enantiostylous species of the subtribe Cassiinae (Fabaceae-Caesalpinioideae) (Z-X Ren, Ed.). *Plant Biology* **20**: 797–801.
- Alves CCE, Bezerra LMA, Matias ACC. 2011.** A importância da conservação/preservação ambiental da Floresta Nacional Do Araripe para a região do Cariri - Ceará/Brasil. *Revista Geográfica de América Central* **2**: 1–10.
- Amorim T, Marazzi B, Soares AA, 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 (H Rennenberg, Ed.). *Plant Biology* **19**: 951–962.
- Apg IV. 2016.** An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society* **181**: 1–20.
- Armbruster WS, Bolstad GH, Hansen TF, Keller B, Conti E, Pélabon C. 2017.** The measure and mismeasure of reciprocity in heterostylous flowers. *New Phytologist* **215**: 906–917.
- Azevedo FP, Conceição A de S. 2017.** The genus *Senna* Mill. (Leguminosae: Caesalpinioideae) in the Serra Geral of Licínio de Almeida, Bahia, Brazil. *Acta Scientiarum. Biological Sciences* **39**: 95–112.
- Azevedo FR, Moura MAR, Arrais MSB, Nere DR. 2011.** Composição da entomofauna da Floresta Nacional do Araripe em diferentes vegetações e estações do ano. *Revista Ceres* **58**: 740–748.
- Barrett SCH. 2002.** The evolution of plant sexual diversity. *Nature Reviews Genetics* **3**: 274–284.
- Batalha MA, Martins FR. 2004.** Reproductive phenology of the cerrado plant community in Emas National Park (central Brazil). *Australian Journal of Botany* **52**: 149–161.

- Bates D., Maechler M., Bolker B., et al. (2018).** lme4: *Linear mixed-effects models using Eigen and S4*. R package version 1.1-21. <https://cran.r-project.org/package=lme4>.
- Buchmann SL. 1983.** Buzz pollination in angiosperms In: Jones CE, Little R., eds. *Handbook of experimental pollination biology*. New York: Van Nostrand Reinhold Company, 73–113.
- Carvalho DA, Oliveira PE. 2003.** Biologia reprodutiva e polinização de *Senna sylvestris* (Vell.) H.S. Irwin & Barneby (Leguminosae, Caesalpinioideae). *Revista Brasileira de Botânica* **26**: 319–328.
- Costa IR, Araújo FS, Lima-Verde LW. 2004.** Flora e aspectos auto-ecológicos de um enclave de cerrado na chapada do Araripe, Nordeste do Brasil. *Acta Botanica Brasilica* **18**: 759–770.
- Dafni A. 1992.** *Pollination ecology: a practical approach*. New York: Oxford University Press.
- Dantas MM, Silva MJ. 2013.** O gênero *Senna* Mill. (Leguminosae, Caesalpinioideae, Cassieae) no Parque Estadual da Serra Dourada, GO, Brasil. *Hoehnea* **40**: 99–113.
- Fox J., Weisberg S. (2018).** car: *An {R} Companion to Applied Regression*. 3rd ed. Thousand Oaks CA: Sage. R package version 3.0-3. <https://cran.r-project.org/package=car>.
- Furtado MT, Matias R, Pérez-Barrales R, Consolaro H. 2021.** Do reciprocal herkogamy and pollinators affect the legitimate pollen flow in distylous species? *Botanical Journal of the Linnean Society* **in press**. doi: 10.1093/botlinnean/boab004
- Gottsberger G, Silberbauer-Gottsberger I. 1988.** Evolution of Flower Structures and Pollination in Neotropical Cassiinae (Caesalpinioideae) Species. *Phyton (Austria)* **28**: 293–320.
- Irwin HS, Barneby RC. 1982.** American cassinae : a synoptical revision of Leguminosae tribe Cassieae, subtribe Cassiinae in the New World. *Memoirs of the New York Botanical Garden* **35**: 1–918.
- Jacquemyn H, Gielen M, Brys R. 2018.** Is sexual organ reciprocity related to legitimate pollen deposition in distylous *Pulmonaria* (Boraginaceae)? *Oikos* **127**: 1216–1224.
- Jammalamadaka SR, SenGupta A. 2001.** *Topics in circular statistics*. Singapore: World Scientific.
- Jesson LK, Barrett SCH. 2002.** Solving the puzzle of mirror-image flowers. *Nature* **417**: 707–707.
- Jesson LK, Barrett SCH. 2003.** The Comparative Biology of Mirror - Image Flowers. *International Journal of Plant Sciences* **164**: 237–249.
- Jesson LK, Barrett SCH. 2005.** Experimental tests of the function of mirror-image flowers. *Biological Journal of the Linnean Society* **85**: 167–179.
- Lemon AJ, Bolker B, Oom S, et al. 2020.** Package ‘plotrix.’
- Lenth, R. (2019).** Emmeans: estimated marginal means, aka least-squares means. R package v. 1.3. 4.
- Ligges U, Mächler M. 2003.** scatterplot3d - An R Package for Visualizing Multivariate Data. *Journal of Statistical Software* **8**: 1–20.
- Lloyd DG, Webb CJ. 1986.** The avoidance of interference between the presentation of pollen

and stigmas in angiosperms I. Dichogamy. *New Zealand Journal of Botany* **24**: 135–162.

Marazzi B, Conti E, Endress PK. 2007. Diversity in Anthers and Stigmas in the Buzz-Pollinated Genus *Senna* (Leguminosae, Cassiinae). *International Journal of Plant Sciences* **168**: 71–391.

Marazzi B, Endress PK. 2008. Patterns and development of floral asymmetry in *Senna* (Leguminosae, Cassiinae). *American Journal of Botany* **95**: 22–40.

Matias R, Pérez-Barrales R, Consolaro H. 2020. Patterns of variation in distylous traits and reproductive consequences in *Erythroxylum* species and populations. *American Journal of Botany* **107**: 910–922.

Mora-Carrera E, Castañeda-Zárate M, Fornoni J, Boege K, Domínguez CA. 2019. On the adaptive value of monomorphic versus dimorphic enantiostyly in *Solanum rostratum*. *Annals of Botany* **123**: 205–212.

Pinheiro M, Sazima M. 2007. Visitantes florais e polinizadores de seis espécies arbóreas de Leguminosae melitófilas na Mata Atlântica no Sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Biociências* **5**: 447–449.

Rasband WS. 1997. ImageJ.

Raupp PP, Matias R, Furtado MT, Consolaro H. 2020. The role of distyly in pollen flow of the hummingbird-pollinated *Palicourea rigida* (Rubiaceae). *Flora* **271**: 1–9.

R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. R version 3.5.2. <https://www.R-project.org/>

Schoen DJ, Morgan MT, Bataillon T. 1996. How does self-pollination evolve? Inferences from floral ecology and molecular genetic variation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **351**: 1281–1290.

Souza IM, Coutinho K, Funch LS. 2012. Estratégias fenológicas de *Senna cana* (Nees & Mart.) H.S. Irwin & Barneby (Fabaceae: Caesalpinioideae) como mecanismo eficiente para atração de polinizadores. *Acta Botanica Brasilica* **26**: 435–443.

Vallejo-Marín M. 2019. Buzz pollination: studying bee vibrations on flowers. *New Phytologist* **224**: 1068–1074.

Webb CJ, Lloyd DG. 1986. The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigmas in angiosperms II. Herkogamy. *New Zealand Journal of Botany* **24**: 163–178.

Westerkamp C. 2004. Ricochet pollination in *Cassias*—and how bees explain enantiostyly In: *Solitary bees: conservation, rearing and management for pollination*. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 225–230.

Wolowski M, Freitas L. 2010. Sistema reprodutivo e polinização de *Senna multijuga* (Fabaceae) em Mata Atlântica Montana. *Rodriguésia* **61**: 167–179.

Tabela 1. Visitantes florais e frequência de visitas em 131 horas de observação em indivíduos de *Senna rugosa* estudados na FLONA Araripe, Ceará, Brasil.

Espécie visitante	Visitas (n)	Frequência de visitas (%)	Comportamento
Abelhas			
<i>Xylocopa</i> sp.	19	2.74	Polinizador
<i>Plebeia</i> sp.	527	76.26	Pilhador
<i>Apis</i> sp.	77	11.14	Pilhador
<i>Augocloria</i> sp.	35	5.06	Pilhador
<i>Trigona</i> sp.	10	1.44	Pilhador
<i>Centris</i> sp.	7	10.13	Pilhador
<i>Tetragonisca</i> sp.	16	2.31	Pilhador

Tabela 2. Morfometria das flores de *Senna rugosa* para o cálculo da inacurácia: média (\pm variância) dos estigmas e anteras de polinização nas flores direitas e esquerdas. Valores negativos de afastamento horizontal indicam que o órgão está posicionado à esquerda do centro floral e valores positivos à direita.

Tipo de órgão	Medidas (mm)		
	Afastamento horizontal	Altura	Profundidade
Flores de pistilo à direita			
Estigma	1.13 (1.02)	1.57 (0.67)	3.34 (1.08)
Antera PA1	-0.71 (0.63)	2.06 (0.56)	2.93 (0.32)
Antera PA2	0.26 (0.80)	2.27 (0.84)	2.71 (0.59)
Antera PA3	1.56 (0.61)	0.91 (0.47)	2.56 (0.85)
Flores de pistilo à esquerda			
Estigma	-0.39 (2.38)	1.64 (0.69)	3.30 (1.14)
Antera PA1	0.19 (0.25)	2.22 (0.44)	2.71 (1.19)
Antera PA2	0.19 (0.65)	2.35 (0.52)	2.41 (0.66)
Antera PA3	-1.57 (0.89)	0.88 (0.35)	2.65 (0.63)

Tabela 3. Estimativas de inacurácia na reciprocidade intra e intermorfo em *Senna rugosa* na FLONA Araripe, Ceará, Brasil. A inacurácia total para cada tipo de órgão (coluna 5) é a soma dos valores de inacurácia do afastamento horizontal, altura e profundidade (colunas 2, 3 e 4).

Os valores entre parênteses representam porcentagens da inacurácia total.

Tipo de órgão	Inacurácia			Total de inacurácia
	Afastamento horizontal	Altura	Profundidade	
Estigma direito				
Intermorfo				
... e PA1 esquerda	2.15 (33.80%)	1.54 (24.22%)	2.67 (41.98%)	6.36
... e PA2 esquerda	2.56 (36.73%)	1.80 (25.82%)	2.61 (37.45%)	6.97
... e PA3 esquerda	9.21 (71.51%)	1.48 (11.49%)	2.19 (17.00%)	12.88
Intramorfo				
... e PA1 direita	5.03 (62.25%)	1.48 (18.32%)	1.57 (19.43%)	8.08
... e PA2 direita	2.58 (38.80%)	1.99 (29.92%)	2.08 (31.28%)	6.65
... e PA3 direita	1.81 (30.57%)	1.57 (26.52%)	2.54 (42.91%)	5.92
Estigma esquerdo				
Intermorfo				
... e PA1 direita	3.11 (50.73%)	1.43 (23.33%)	1.59 (25.94%)	6.13
... e PA2 direita	3.59 (47.36%)	1.92 (25.33%)	2.07 (27.31%)	7.58
... e PA3 direita	6.80 (61.71%)	1.69 (15.33%)	2.53 (22.96%)	11.02
Intramorfo				
... e PA1 esquerda	2.96 (41.69%)	1.47 (20.70%)	2.67 (37.61%)	7.10
... e PA2 esquerda	3.37 (43.99%)	1.71 (22.33%)	2.58 (33.68%)	7.66
... e PA3 esquerda	4.65 (55.09%)	1.61 (19.08%)	2.18 (25.83%)	8.44

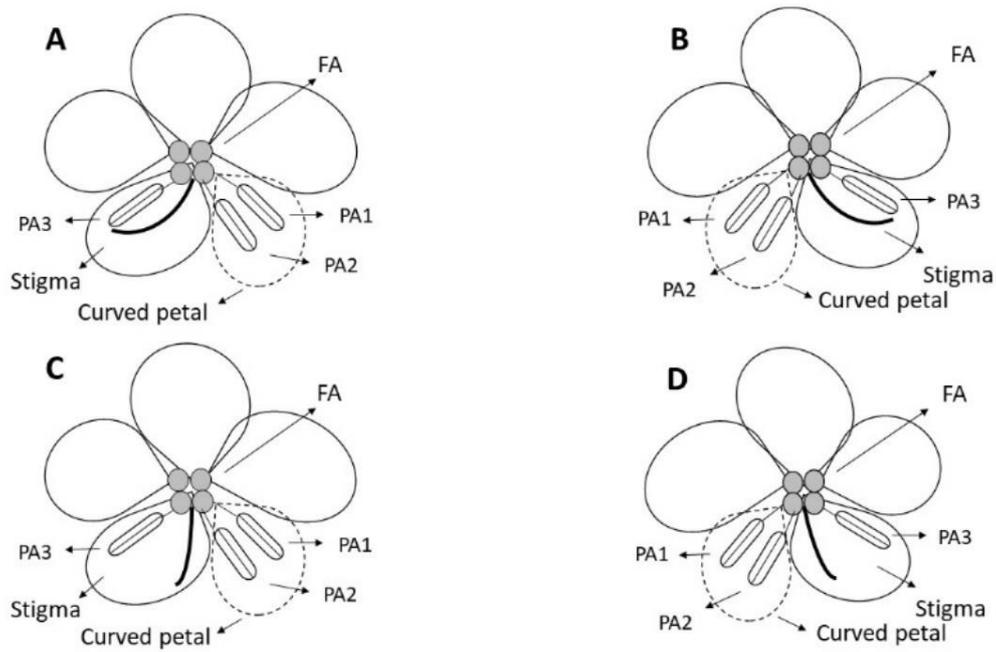


Figura 1. Representação esquemática da posição relativa de estigmas e anteras em flores direitas (A), esquerdas (B) e centrais (C e D) de *Senna rugosa*. FA= anteras de alimentação; PA1 e PA2= anteras de polinização opostas ao estigma; PA3= anteras de polinização laterais ao estigma.

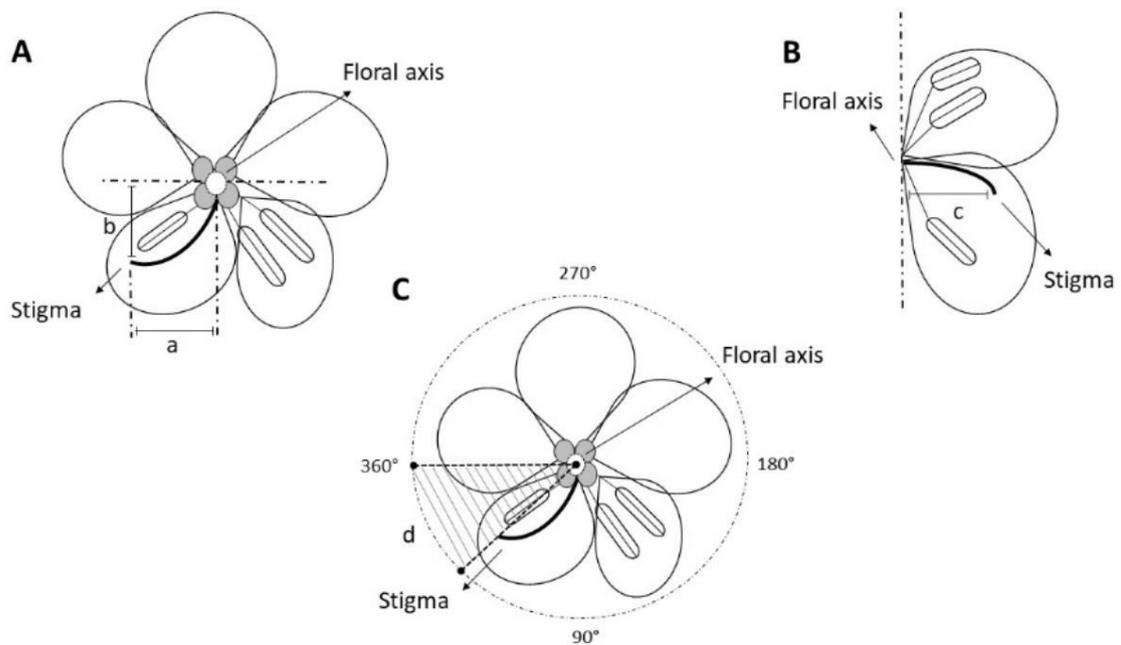


Figure 2. Representação esquemática da mensuração do afastamento horizontal (Figura A, letra a), altura (Figura A, letra b), profundidade (Figura B, letra c) e angulação (Figura C, letra d) dos órgãos sexuais de *Senna rugosa*, exemplificados pela morfometria do estigma.

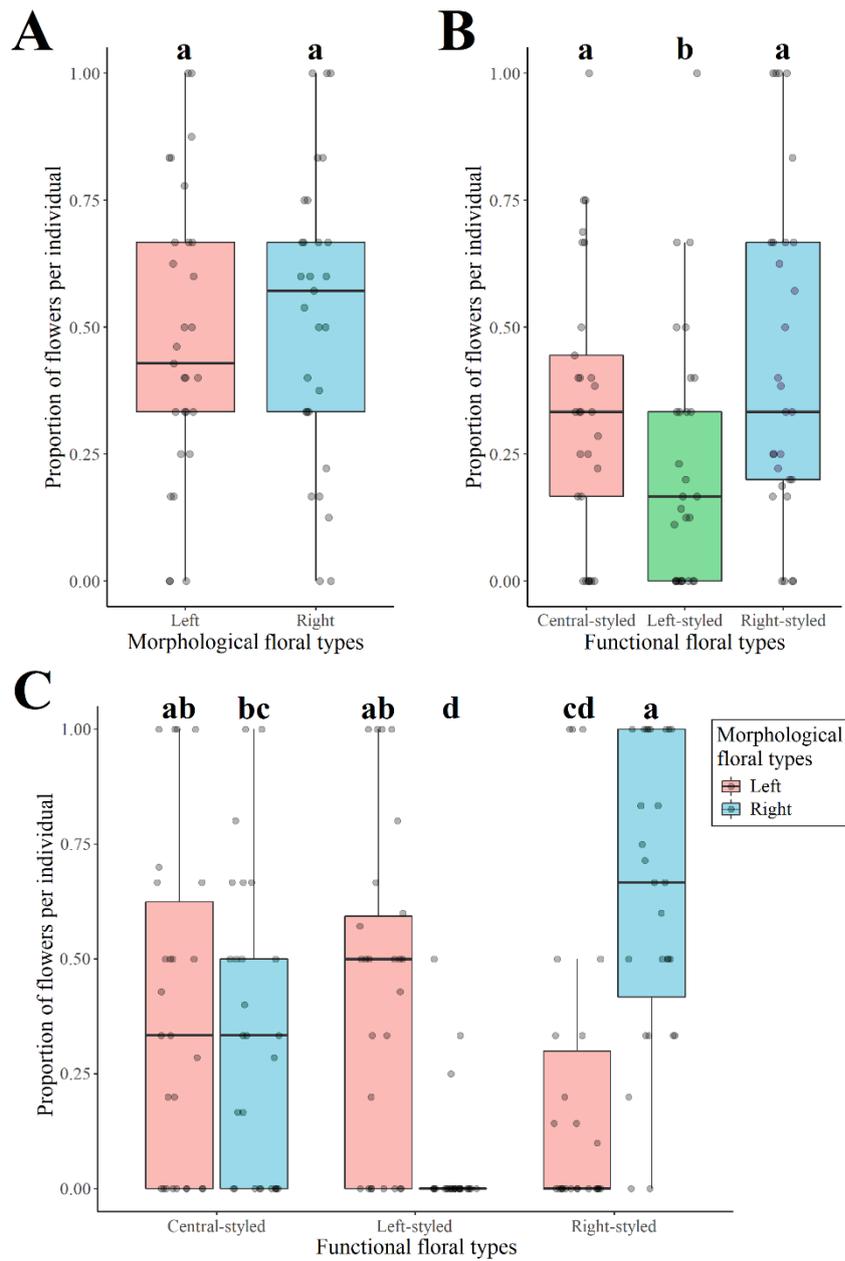


Figura 3. Bloxplots da proporção dos tipos florais morfológicos (A) e funcionais (B) em indivíduos de *Senna rugosa* estudados na FLONA Araripe, Ceará, Brasil. A funcionalidade de acordo com o tipo floral morfológico é mostrada em C. Os pontos cinzas mostram os dados observados. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0.05$).

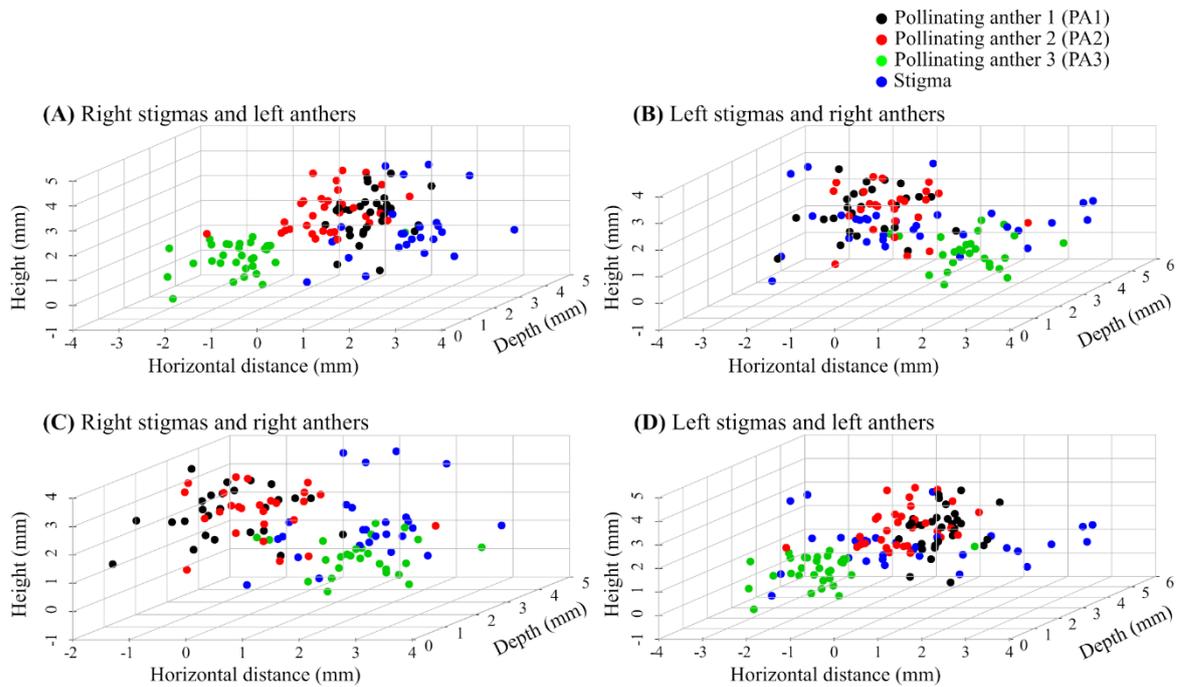


Figura 4. Gráficos de dispersão tridimensionais das três medidas feitas nos estigmas e anteras de polinização das flores direitas e esquerdas de *Senna rugosa* estudadas na FLONA Araripe, Ceará, Brasil. As figuras A e B mostram estigmas com anteras intermorfo e as figuras C e D mostram estigmas com anteras intramorfo.

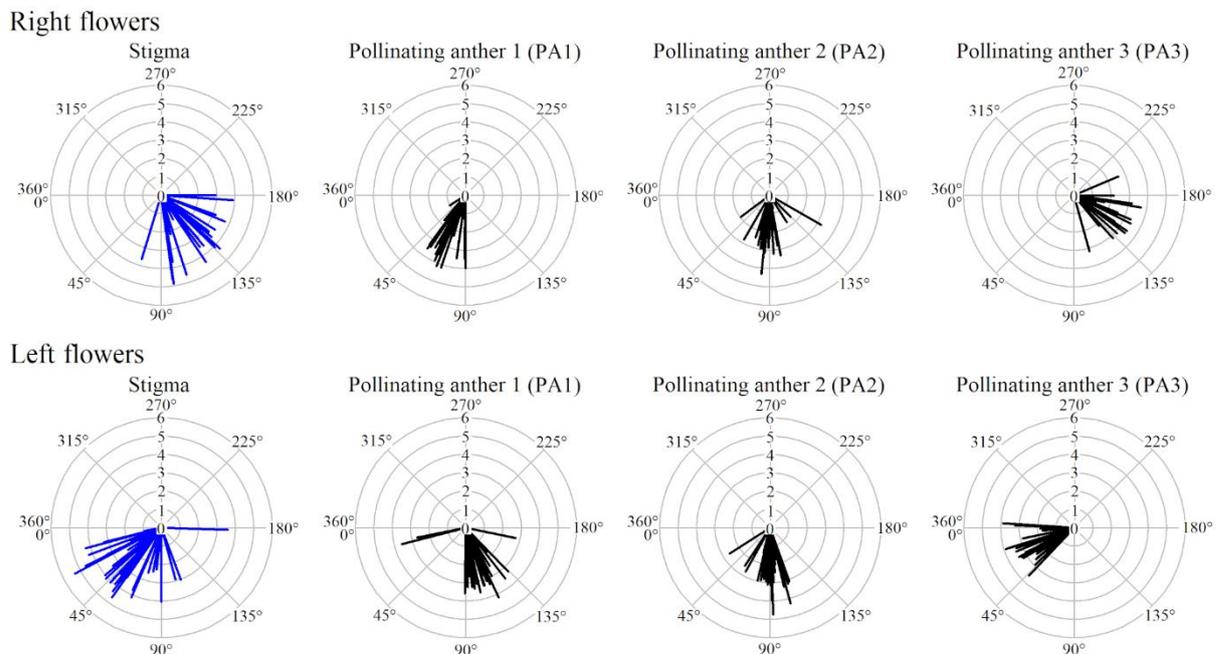


Figura 5. Gráficos circulares considerando as medidas de angulação e profundidade de estigmas (linhas azuis) e diferentes anteras de polinização (linhas pretas) de flores direitas e

esquerdas de *Senna rugosa* estudadas na FLONA Araripe, Ceará, Brasil. Cada círculo representa a vista frontal de um órgão sexual, mostrando sua variação dentro de cada tipo floral. O eixo vertical (0-6 mm) representa a profundidade do respectivo órgão sexual.

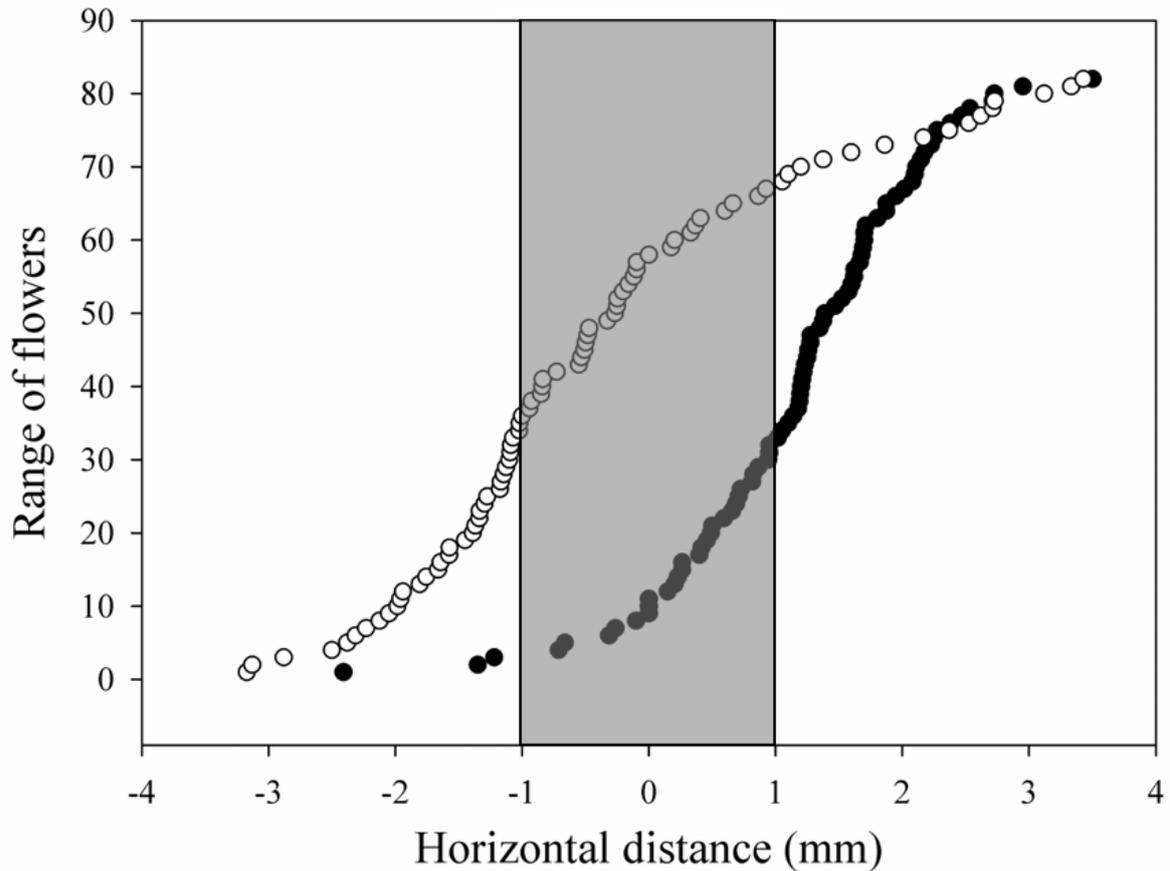


Figura 6. Gráfico de dispersão do afastamento horizontal dos estiletos de flores direitas (preto) e esquerdas (branco) de *Senna rugosa* estudados na FLONA Araripe, Ceará, Brasil. Os estiletos de cada tipo floral foram classificados pelo afastamento horizontal para ilustrar sua variação. A área sombreada indica um intervalo em que os estiletos foram considerados funcionalmente centrais.

5. ANEXOS

Normas para publicação no periódico *Annals of Botany*

Preparing the Article File

(Always consult a recent issue of *Annals of Botany* for layout and style)

Text should be typed using size 12 Times New Roman or Courier, double-spaced throughout and with an approx. 25 mm margin. All pages should be numbered sequentially. Each line of the text should also be numbered, with the top line of each page being line 1. The article file should be in PC-compatible Microsoft Word - file type DOC [please make sure the "Language" is "English (U.K)" via Tools → Language → Set Language]. RTF files are also acceptable. Please do not use the Windows Vista DOCX format: if you have created the text in this format, please save the files as RTF before submitting them. Please do *not* submit PDFs, desktop publishing files or LaTeX files. The article file should *include* a list of any figure legends but *exclude* any figures themselves – these should be submitted separately, with each figure in a separate file. Tables should be included at the end of the article file, in a Word format and *not* embedded as an image/picture. For more details see below under PREPARING TABLE and FIGURE FILES, SUPPLEMENTARY INFORMATION FILES AND VIDEO FILES.

It is NOT journal style to have footnotes within articles. Any such notes must be incorporated into the main text, for example within brackets or as a separate paragraph.

The first page should state the type of article (e.g. Original Article, Technical Article) and provide a concise and informative full title followed by the names of all authors. Where necessary, each name should be followed by an identifying superscript number (^{1, 2, 3} etc.) associated with the appropriate institutional address to be entered further down the page. For papers with more than one author, the corresponding author's name should be followed by a superscript asterisk*. The institutional address(es) of each author should be listed next, each address being preceded by the relevant superscript number where appropriate. A running title of not more than 75 characters, including spaces, should also be provided, followed by the e-mail address of the corresponding author. Please follow the layout used for the first page of papers published in *Annals of Botany*.

The second page should contain a structured Abstract not exceeding 300 words made up of bulleted headings. For 'ORIGINAL ARTICLES' these heading will normally be as follows:

- *Background and Aims*
- *Methods*
- *Key Results*
- *Conclusions*

Alternative bulleted headings, such as ' *Background* ', ' *Scope* ' and ' *Conclusions* ', are also acceptable for 'REVIEWS', 'INVITED REVIEWS', 'BOTANICAL BRIEFINGS', 'TECHNICAL ARTICLES' papers and 'VIEWPOINT' papers.

The Abstract should be followed by between three and 12 Key words that include the complete botanical name(s) of any relevant plant material. If many species are involved, species groups should be listed instead. Note that essential words in the title should be repeated in the key words since these, rather than the title, are used in some electronic searches. Title, Abstract and Key words should be self-explanatory without reference to the remainder of the paper.

The third and subsequent pages should comprise the remaining contents of the article text. 'ORIGINAL ARTICLES' will usually have the structure INTRODUCTION, MATERIALS AND METHODS, RESULTS, DISCUSSION, ACKNOWLEDGEMENTS and LITERATURE CITED followed by a list of captions to any figures.

The RESULTS section should not include extensive discussion and data should not be repeated in both graphical and tabular form. The DISCUSSION section should avoid extensive repetition of the RESULTS and *must* finish with some conclusions.

Abbreviations are discouraged *except* for units of measurement, standard chemical symbols (e.g. S, Na), names of chemicals (e.g. ATP, Mes, Hepes, NaCl, O₂), procedures (e.g. PCR, PAGE, RFLP), molecular terminology (e.g. bp, SDS) or statistical terms (e.g. ANOVA, s.d., s.e., *n*, *F*, *t*-test and *r*²) where *these are in general use*. Other abbreviations should be spelled out at first mention and all terms must be written out in full when used to start a sentence. Abbreviations of scientific terms should not be followed by a full stop. Use the minus index to indicate 'per' (e.g. m⁻³, L⁻¹, h⁻¹) except in such cases as 'per plant' or 'per pot'. If you decide that a list of abbreviations would help the reader, this should be included as an Appendix.

Units of Measurement. Use the *Système international d'unités* (SI) wherever possible. If non-SI units have to be used, the SI equivalent should be added in parentheses at first mention. For units of volume, expressions based on the cubic metre (e.g. 5 × 10⁻⁹ m³, 5 × 10⁻⁶ m³ or 5 × 10⁻³ m³) or the litre (e.g. 5 µL, 5 mL, 5 L) are acceptable, but one or other system should be used consistently throughout the manuscript. Typical expressions of concentrations might be 5 mmol m⁻³, 5 µM (for 5 µmol L⁻¹), or 25 mg L⁻¹. The Dalton (Da), or more conveniently the kDa, is a permitted non-SI unit of protein mass.

Names of plants must be written out in full (Genus, species) in the abstract and again in the main text for every organism at first mention (but the genus is only needed for the first species in a list within the same genus, e.g. *Lolium annuum*, *L. arenarium*). The authority (e.g. L., Mill., Benth.) is *not* required unless it is controversial. Guidance for naming plants correctly is given in The International Plant Names Index and in *The Plant Book: a Portable Dictionary of the Vascular Plants* (1997) by D.J. Mabberley (Cambridge: Cambridge University Press. ISBN 0521-414210-0). After first mention, the generic name may be abbreviated to its initial (e.g. *A. thaliana*) except where its use causes confusion.

Any cultivar or variety should be added to the full scientific name e.g. *Solanum lycopersicum* 'MoneyMaker' following the appropriate international code of practice. For guidance, refer to the ISHS *International Code of Nomenclature for Cultivated Plants* (2004) edited by C.D. Brickell, B. R. Baum, W. L. A. Hetterscheid, A. C. Leslie, J. McNeill, P. Trehane, F. Vrugtman, J. H. Wiersema (ISBN 3-906166-16-3).

Once defined in full, plants may also be referred to using vernacular or quasi-scientific names without italics or uppercase letters (e.g. arabidopsis, dahlia, chrysanthemum, rumex, soybean, tomato). This is often more convenient.

Items of Specialized Equipment mentioned in MATERIALS AND METHODS should be accompanied by details of the model, manufacturer, and city and country of origin.

Numbers up to and including ten should be written out unless they are measurements. All numbers above ten should be in numerals except at the start of sentences. Dates should be in the form of 10 Jan. 1999, and Clock Time in the form of 1600 h.

Mathematical equations must be in proper symbolic form; word equations are not acceptable. Each quantity should be defined with a unique *single character* or symbol together with a descriptive subscript if necessary. Each subscript should also be a *single character* if possible, but a short word is permissible. For example, a relationship between plant dry mass and fresh mass should appear as $M_d = 0.006 M_f^{1.461}$, where M_d is plant dry mass and M_f is plant fresh mass; and not as $DM = 0.006 FM^{1.461}$.

The meaning of terms used in equations should be explained when they first appear. Standard conventions for use of *italics* only for variables should be followed: normal (Roman) font should be used for letters that are identifiers. Thus in the above example, M is the *variable quantity* of mass, the subscripts d and f are identifiers for dry and fresh respectively.

Special note regarding 'Equation Editor' and other software for presentation of mathematics. Symbols and equations that are imported into Word documents as embedded objects from other software packages are generally incompatible with typesetting software and have to be re-keyed as part of the proof-making process. It is therefore strongly advisable to type symbols and equations directly into MS Word wherever possible. Importing from other software should ideally be confined to situations where it is essential, such as two-line equations (i.e. where numerators and denominators cannot be set clearly on a single line using '/') and to symbols that are not available in Word fonts. This will minimize the risk of errors associated with rekeying by copyeditors.

Summary statistics should be accompanied by the number of replicates and a measure of variation such as standard error or least significance difference. Analysis of variance is often appropriate where several treatments are involved. Presentation of an abridged ANOVA table is permissible when its use illustrates critical features of the experiment.

Chemical, biochemical and molecular biological nomenclature should be based on rules of the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) and the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB). Chapter 16 of *Scientific Style and Format. The CBE Manual for Authors, Editors, and Publishers 6th edn.*, by Edward J. Huth (Cambridge: Cambridge University Press. ISBN 0-521-47154-0) gives guidelines.

Sequence information. Before novel sequences for proteins or nucleotides can be published, authors are required to deposit their data with one of the principal databases comprising the International Nucleotide Sequence Database Collaboration: EMBL Nucleotide Sequence Database, GenBank, or the DNA Data Bank of Japan and to include an accession number in the paper. Sequence matrices should only be included if alignment information is critical to the message of the paper. Such matrices can be in colour but should not occupy more than one printed page. Larger matrices will only be printed by special agreement but may more readily be published electronically as Supplementary Information (see below).

Gene nomenclature. Species-specific rules on plant gene nomenclature are available for:

- maize;
- rice;
- wheat and
- arabidopsis.

Otherwise, *Annals of Botany* adopts the following conventions for abbreviations: each gene abbreviation is preceded by letters identifying the species of origin. Lower-case italics should be used for mutant genes (e.g. *Rp-etr1*); upper-case italics (e.g. *Le-ACO1*) for wild-type genes; upright lower-case for proteins of mutated genes (e.g. Le-adh1); and upright upper-case for proteins of wild-type genes (e.g. At-MYB2). It may often be helpful to readers if the names of genes or gene families are spelled out in full at first mention.

Citations in the text. These should take the form of Felle (2005) or Jacobsen and Forbes (1999) or (Williamson and Watanabe, 1987; Rodrigues, 2002 *a*, *b*) and be ordered chronologically. Papers by three or more authors, even on first mention, should be abbreviated to the name of the first author followed by et al. (e.g. Zhang *et al.*, 2005). If two different authors have the same last name, give their initials (e.g. NH Kawano, 2003) to avoid confusion. Only refer to papers as 'in press' if they have been accepted for publication in a named journal, otherwise use the terms 'unpubl. res.', giving the initials and location of the person concerned. (e.g. H Gautier, INRA, Lusignan, France, unpubl. res.) or 'pers. comm.' (e.g. WT Jones, University of Oxford, UK, 'pers. comm.')

The LITERATURE CITED should be arranged alphabetically based on the surname of the first or sole author. Where the same sole author or same first author has two or more papers listed, these papers should be grouped in year order. Where such an author has more than one paper *in the same year*, these should be ordered with single authored papers first followed by two-author papers (ordered first alphabetically based on the second author's surname, then by year), and then any three-or-more-author papers (in year order only). Italicized letters '*a*', '*b*', '*c*', etc., should be added to the date of papers with the same first authorship and year.

For papers with *six* authors or fewer, please give the names of *all* the authors. For papers with *seven* authors or more, please give the names of the *first three* authors only, followed by *et al.*

Each entry must conform to one of the following styles according to the type of publication.

Books

Öpik H, Rolfe S. 2005. *The physiology of flowering plants. Physicochemical and environmental plant physiology*, 4th edn. Cambridge: Cambridge University Press.

Chapters in books

Scandalios JG. 2001. Molecular responses to oxidative stress. In: Hawkesford MJ, Buchner P, eds. *Molecular analysis of plant adaptation to the environment*. Dordrecht: Kluwer, 181-208.

Research papers

Popper ZA, Fry SC. 2003. Primary cell wall composition of bryophytes and charophytes. *Annals of Botany* 91 : 1–12.

Papers published online ahead of print

Forster MA, Ladd B, Bonser SP. 2011. Optimal allocation of resources in response to shading and neighbours in the heteroblastic species, *Acacia implexa*. *Annals of Botany*, in press. doi:10.1093/aob/mcq228.

NB include the doi number: a search for the doi will always be directed to the most recent version, so the reader will be able to find the final published paper as soon as it appears.

Online-only journals

Levine N, Ben-Zvi G, Seifan M, Giladi I. 2019. Investment in reward by ant-dispersed plants consistently selects for better partners along a geographic gradient. *AoB PLANTS* 11: plz027. doi: 10.1093/aobpla/plz027

NB include the doi number after the volume and article number.

Theses

Tholen D. 2005. *Growth and photosynthesis in ethylene-insensitive plants*. PhD Thesis, University of Utrecht, The Netherlands.

Anonymous sources

Anonymous . Year. *Title of booklet, leaflet, report, etc.* City: Publisher or other source, Country.

References to websites should be structured as: Author(s) name, author(s) initial(s). year. *Full title of article* . Full URL. Date of last successful access (e.g. 12 Jan. 2003)

Acknowledgements

In the ACKNOWLEDGEMENTS, please be brief. 'We thank . . .' (not 'The present authors would like to express their thanks to . . .'). We encourage author-contribution statements within the Acknowledgement section.

Funding information

Details of all funding sources for the work in question should be given in a separate section entitled 'Funding'. This should appear before the 'Acknowledgements' section.

The following rules should be followed:

- The sentence should begin: 'This work was supported by ...'
- The full official funding agency name should be given, i.e. 'the National Cancer Institute at the National Institutes of Health' or simply 'National Institutes of Health' not 'NCI' (one of the 27 subinstitutions) or 'NCI at NIH'
- Grant numbers should be complete and accurate and provided in brackets as follows: '[grant number ABX CDXXXXXX]'

- Multiple grant numbers should be separated by a comma as follows: '[grant numbers ABX CDXXXXXX, EFX GHXXXXXX]'
- Agencies should be separated by a semi-colon (plus 'and' before the last funding agency)
- Where individuals need to be specified for certain sources of funding the following text should be added after the relevant agency or grant number 'to [author initials]'.

An example is given here: 'This work was supported by the National Institutes of Health [P50 CA098252 and CA118790 to R.B.S.R.] and the Alcohol & Education Research Council [HFY GR667789].

Oxford Journals will deposit all NIH-funded articles in PubMed Central. See Author Resources for details. Authors must ensure that manuscripts are clearly indicated as NIH-funded using the guidelines above.

Crossref Funding Data Registry

In order to meet your funding requirements authors are required to name their funding sources, or state if there are none, during the submission process. For further information on this process or to find out more about CHORUS, visit the CHORUS initiative.

Appendix

If elaborate use is made of units, symbols and abbreviations, or a detailed explanation of one facet of the paper seems in order, further details may be included in a separate APPENDIX placed after the LITERATURE CITED.

For more detail and information on types of files required for text, graphics and tables etc., please see the next section.