

Natan Messias de Almeida

**Enantiostilia e relações reprodutivas em
espécies da subtribo Cassiinae (Fabaceae-
Caesalpinioideae)**

Recife, 2014

Natan Messias de Almeida

**Enantiostilia e relações reprodutivas em
espécies da subtribo Cassiinae (Fabaceae-
Caesalpinioideae)**

Orientadora: Dra. Cibele Cardoso de Castro

Co orientador: Dr. José Alves Siqueira Filho

Co orientador: Dr. Paulo Eugênio Oliveira

Recife, 2014

Ficha catalográfica

A447e Almeida, Natan Messias de
Enantiostilia e relações reprodutivas em espécies da subtribo
Cassiinae (Fabaceae - Caesalpinioideae) / Natan Messias de
Almeida. – Recife, 2014.
107 f. : il.

Orientadora: Cibele Cardoso de Castro.
Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade Federal Rural de
Pernambuco, Departamento de Biologia, Recife, 2014.
Inclui referências e anexo(s).

1. Enantiostilia 2. Cassiinae 3. *Chamaecrista* 4. *Senna*
5. Biologia reprodutiva I. Castro, Cibele Cardoso de, orientadora
II. Título

CDD 581

NATAN MESSIAS DE ALMEIDA

ENANTIOSTILIA E RELAÇÕES REPRODUTIVAS EM ESPÉCIES DA SUBTRIBO
CASSIINAE (FABACEAE-CAESALPINIOIDEAE)

Tese apresentada e _____ em ____/____/____

Orientadora:

Profª. Dra. Cibele Cardoso de Castro - UFRPE

Co orientadores:

Profº. Dr. Paulo Eugênio de Oliveira - UFU

Profº. Dr. José Alves de Siqueira Filho – UNIVASF

Examinadores:

Profª Isabel Cristina Sobreira Machado - UFPE (Titular)

Profª. Drª. Ana Virgínia de Lima Leite - UFRPE (Titular)

Profª. Drª. Margareth Ferreira de Sales- UFRPE (Titular)

Profº. Drº. Hélder Nagai Consolaro - UFG (Titular)

Profª. Drª. Elisângela Lúcia de Santana Bezerra - UFRPE (1ª Suplente)

Profª. Drª. Tarcila Correia de Lima Nadia - UFPE-CAV (2ª Suplente)

Recife, 2014

Ao meu povo.

Agradecimentos

A minha mãe (Vera) por tudo.

Ao meu irmão (Jesse) pelo apoio direto e indireto em todos os momentos.

Aos meus orientadores em especial a Cibele, por todo apoio, compreensão e confiança.

A minha companheira Andrezza, pelo companheirismo e lealdade.

Aos amigos Rodrigo, Rafael, Vinícius e Duílio pela ajuda em todos os momentos.

A administração da RPPN Nossa Senhora do Oiteiro e especial ao seu Zé e família pela permissão da realização da pesquisa na área e apoio no campo.

A toda equipe do CRAD-UNIVASF pelo apoio logístico e auxílio no desenvolvimento do estudo.

Aos companheiros de campo Thatiany e Carlos Roberto, por toda ajuda na execução do trabalho.

A todos integrantes do programa, professores e funcionários pelo apoio em diversos instantes.

A CAPES pela bolsa concedida.

Obrigado.

“O homem que vê o mundo aos 50 anos do mesmo modo que ele via aos 20 anos, perdeu 30 anos de sua vida.”

Cassius Clay (Muhammad Ali)

Lista de tabelas

Capítulo 1

Tabela 1. Média de flores (dp) produzidas por indivíduo e populações diariamente e total, após sete dias consecutivos em espécies enantiofíticas monomórficas em uma área de caatinga no nordeste do Brasil. CA=*C. amiciella*; CC= *C. calycioides*; CR=*C. repens*; CS=*C. serpens*; SM=*S. macranthera*; SMP=*S. macranthera* var. *pubibunda*; SMT=*S. martiana*; SS=*S. spectabilis*. Ind./dia: média da produção diária por indivíduo; Ind./total: média da produção total por indivíduo; Pop./dia média de flores produzidas por dia pela população; Pop. total: produção total da população.

38

Capítulo 2

Tabela 1. Resultados do sistema reprodutivo de sete espécies enantiofíticas da subtribo Cassiinae. CA=*C. amiciella*; CC=*C. calycioides*; CREP=*C. repens*; CROT=*C. rotundifolia*; SMC=*S. macranthera*; SMP=*S. macranthera* var. *pubibunda*; SMT=*S. martiana*; SMT#= *S. martiana* (vibração com diapasão); SMT**=*S. martiana* (vibração com barbeador elétrico); PN=Polinização Natural; AM=Autopolinização Manual; AE=Autopolinização espontânea; PC INTRA=Polinização Cruzada Intramorfo; PC INTER=Polinização Cruzada Intermorfo; Frutos/Flores/%; Teste qui-quadrado ou G <p=0,05.

60

Capítulo 3

Tabela 1. Espécies de Cassiinae, suas respectivas abreviações e a origem do material utilizado.

83

Capítulo 4

Table 1. Number of right, left and bicarpellate flowers of *Senna trachypus* and *S. macranthera* var. *micans* in an area of Caatinga, NE Brazil. Different letters in the same line indicate statistically different values (Qui-square test).

91

Lista de figuras

Capítulo 1



Figura 1. Número de flores direitas (D)  e esquerdas (E)  produzidas na população diariamente e o total durante sete dias consecutivos por espécies enantiostílicas monomórficas em uma área de caatinga no nordeste do Brasil. A) *Chamaecrista amiciella*; B) *C. calycioides*; C) *C. repens*; D) *C. serpens*; E) *Senna macranthera* var. *pudivunda*; F) *S. macranthera*; G) *S. martiana*; H) *S. spectabilis*. Teste qui quadrado com valores não significativos $< p=0,05$. 39







Figura 2. Número de indivíduos classificados como funcionalmente direitos (FD) , funcionalmente esquerdos (FE)  e recíprocos (REC) , diariamente e o total (acumulado) após sete dias consecutivos, por espécies enantiostílicas monomórficas em uma área de caatinga no nordeste do Brasil. A) *Chamaecrista amiciella*; B) *C. repens*; C) *Senna macranthera*; D) *S. macranthera* var. *pudivunda*; E) *S. martiana*; F) *S. spectabilis* 40

Figura 3. Número de eventos de repetição das categorias funcionais funcionalmente direitos (FD) , funcionalmente esquerdos (FE)  e recíprocos (REC) , de espécies enantiostílicas monomórficas em uma área de caatinga no nordeste do Brasil. A) *Chamaecrista amiciella*; B) *C. repens*; C) *Senna macranthera*; D) *S. macranthera* var. *pudivunda*; E) *S. martiana*; F) *S. spectabilis*. 41

Capítulo 2

Figura 1. Locais de deposição e captação do pólen. 1) deposição das anteras de polinização; 2) deposição das anteras de alimentação; e 3) captação de pólen no corpo dos polinizadores de seis espécies enantiostílicas da subtribo Cassiinae. A) *Chamaecrista amiciella*; B) *C. calycioides*; C) *C. repens*; D) *C. rotundifolia*; E) *Senna macranthera*; F) *S. macranthera* var. *pudivunda*; G) *S. martiana*. 61

Figura 2. Tubos polínicos provenientes de polinizações cruzadas manuais intra e intermorfos penetrando em pistilos e óvulos de espécies enantiostílicas da subtribo Cassiinae. A) *Senna martiana* (Polinização Cruzada Intramorfo); B) *S. macranthera* (Polinização Cruzada Intramorfo); C) *S. macranthera* var. *pudivunda* (Polinização Cruzada Intermorfo); D) *Chamaecrista repens* (Polinização Cruzada Intermorfo). 62

Capítulo 3

Figura 1. Análise de similaridade (Jaccard) de espécies enantiostílicas em relação aos tipos enantiostílicos baseados em características morfológicas e funcionais das flores. ***= espécies sem enantiostilia. Seções de *Senna* e *Chamaecrista* de Irwin & Barneby (1982), classificações propostas por Conceição *et al.* (2009) para *Chamaecrista* e por Marazzi *et al.* (2006) para *Senna*.

79

Figura 2. Flores de espécies da subtribo Cassiinae representantes dos tipos de enantiostilia. A) *Chamaecrista ramosa* (tipo ramosa); B) *C. repens* (tipo repens); C) *C. acosmifolia* var. *acosmifolia* (tipo *acosmifolia*); D) *Senna macranthera* var. *pudibunda* (tipo *macranthera*); E) *S. cana* (tipo cana); F) *S. martiana* (tipo *martiana*); G) *C. flexuosa* (tipo *flexuosa*).

80

Figura 3. Análise de similaridade (Jaccard) de espécies enantiostílicas em relação aos tipos de heteranteria baseados em características morfológicas e funcionais do androceu. TA= tamanho das anteras; CO= coloração das anteras; PA= posicionamento das anteras; PP= posicionamento dos poros das anteras; AA= afunilamento das anteras; ***= espécie sem heteranteria.

81

Figura 4. Análise de similaridade (Jaccard) de espécies enantiostílicas em relação à interação entre os tipos enantiostílicos (baseados em características morfológicas e funcionais das flores) e os tipos de heteranteria (baseados em características do androceu). TA= tamanho das anteras CO= Coloração das anteras; PA= posicionamento das anteras; PP= posicionamento dos poros das anteras; AA= afunilamento das anteras. *= espécies sem enantiostilia.

82

Capítulo 4

Figure 1. Flowers of *Senna macranthera* var. *micans* and *S. tracchypus* bearing bicarpellate gynoecium in an area of Caatinga, NE Brazil. A-C: Left, right and bicarpellate flowers of *Senna macranthera* var. *micans*; D-F: Left, right and bicarpellate flowers of *Senna tracchypus*.

92

Sumário

Lista de tabelas	vii
Lista de figuras	viii
Resumo Geral	xii
General Abstract	xiii
1. Introdução	1
2. Revisão bibliográfica	4
3. Referências bibliográficas	11
4. Capítulo 1. Dinâmica de produção de morfos florais por espécies enantiofíticas da subtribo Cassiinae (Fabaceae-Caesalpinioideae) em uma área de caatinga no nordeste do Brasil	22
Resumo	24
Introdução	25
Material e métodos	26
Resultados	28
Discussão	29
Referências	33
5. Capítulo 2. Mecanismos morfológicos e genéticos na reprodução de espécies enantiofíticas da subtribo Cassiinae	42
Resumo	44
Introdução	45
Material e métodos	46
Resultados	48

Discussão	51
Referências	54
6. Capítulo 3. Tipos enantiostílicos e heteranteria em espécies da subtribo Cassiinae (Fabaceae-Caesalpinioideae)	63
Resumo	65
Introdução	66
Material e métodos	67
Resultados	69
Discussão	70
Referências	75
7. Capítulo 4. Bicarpellate gynoecium in enantiostylous species of <i>Senna</i> Mill. (Fabaceae, Caesalpinioideae, Cassiinae): a new reproductive strategy?	86
Abstract	88
Introduction	89
Material and methods	89
Results and discussion	89
References	90
8. Considerações finais	93
9. Anexos	95

Resumo geral

A enantioestilia é um tipo de hercogamia recíproca conhecida há mais de um século, contudo poucos estudos foram realizados acerca da investigação da sua funcionalidade. A subtribo Cassiinae é bem representada quanto à enantioestilia, apresentando a maioria das suas espécies enantioestílicas. Este estudo teve como objetivo avaliar a biologia reprodutiva de espécies da subtribo Cassiinae com ênfase na investigação da funcionalidade da enantioestilia e suas relações reprodutivas. No primeiro capítulo foi observada a dinâmica da floração em oito espécies da subtribo Cassiinae, quatro do gênero *Chamaecrista* e quatro do gênero *Senna*. Isoplezia foi encontrada para todas as espécies, além de diferentes estratégias na dinâmica da floração gerando indivíduos funcionalmente dimórficos, elevando as taxa de polinização cruzada. O capítulo dois traz resultados acerca de padrões de deposição e captação de pólen, comportamento dos visitantes e sistema reprodutivo de sete espécies da subtribo Cassiinae, quatro do gênero *Chamaecrista* e três do gênero *Senna*. A maioria das espécies apresentou padrão de deposição e captação de pólen encontrado para outras espécies enantioestílicas. A enantioestilia não mostrou influência na ocorrência de incompatibilidade nas espécies *Senna macranthera* var. *pubibunda* e *S. martiana*. No terceiro capítulo foram criados tipos enantioestílicos, além de verificados os tipos de heteranteria para espécies da subtribo Cassiinae enantioestílicas através da análise de 62 espécies. Foram identificados sete tipos enantioestílicos nas espécies observadas. Todos os tipos de heteranteria foram visualizados. O quarto capítulo desta tese traz o relato de uma possível nova estratégia reprodutiva enantioestílica em duas espécies do gênero *Senna*. As espécies apresentam dois gineceus por flor, o que é incomum para espécies de Fabaceae. Esta mudança na morfologia das flores parece estar relacionada a um aumento na aptidão reprodutiva das espécies. Os resultados obtidos, de forma geral, mostram a diversidade na reprodução de espécies da subtribo Cassiinae, com a adoção de diferentes estratégias reprodutivas que levam a alterações da morfologia floral e consequente diferenciações nas relações com os animais visitantes das suas flores. Este estudo traz informações relevantes e em alguns casos inéditas para o conhecimento da reprodução de espécies deste grupo, contribuindo com a conservação das mesmas nos seus ambientes naturais.

Palavras chave: Espécies enantioestílicas, *Chamaecrista*, *Senna*, mecanismos reprodutivos, diversidade reprodutiva.

General Abstract

Enantiostyly is a kind of reciprocal herkogamy known for over a century, however few studies investigated its functionality. It is well represented within the Cassiinae subtribe. The aim of this study was to evaluate the reproductive biology of Cassiinae subtribe species, focusing on the functionality of enantiostyly and its reproductive relations. In Chapter 1, the flowering dynamics was noticed in eight species, four *Chamaecrista* and four *Senna*. Isoplethy was found in all studied species, beyond different strategies in flowering dynamics that generate functionally dimorphic individuals, increasing cross pollination rates. Chapter 2 brings results about patterns of pollen deposition and capture, floral visitors' behavior and breeding system of seven species, four *Chamaecrista* and three *Senna*. Most species presented a pattern of pollen deposition and capture recorded in other enantiostylous species. In Chapter 3 it was suggested seven enantiostylous types based on heteranthery type of 62 Cassiinae. The Chapter 4 brings the report of a possible new enantiostyly reproductive strategy in two species of *Senna* genus. The species presented two gynoeceium, an unusual feature in Fabaceae species. This floral variation seems to be related to an increase in the reproductive fitness. These results, in general, show the reproductive diversity in species of Cassiinae subtribe, with adoption of different reproductive strategies leading to floral morphology changes and subsequent differentiation in the flowers and visitors relations. This study brings relevant and unpublished informations for reproductive knowledge of Cassiinae species

Key words: Enantiostilous species, *Chamaecrista*, *Senna*, reproductive mechanism, reproductive diversity.

1. Introdução

A enantiostilia representa um exemplo de hercogamia recíproca, caracterizando-se por apresentar morfos florais que diferem reciprocamente em relação ao posicionamento dos elementos sexuais (Barrett 2002) e, em alguns casos, também das pétalas (Almeida et al. 2013a, b). De maneira geral, indivíduos enantiostílicos apresentam flores com o gineceu voltado para a direita ou esquerda em relação ao centro floral, resultando em flores que formam imagens especulares (Jesson & Barrett 2002).

Esse polimorfismo pode ocorrer nas formas monomórfica e dimórfica. Na enantiostilia monomórfica os indivíduos apresentam flores de diferentes morfos de forma aleatória (randômica), alternada (não randômica) ou até mesmo um único morfo por inflorescência. Na enantiostilia dimórfica os indivíduos apresentam apenas um morfo floral, o que gera indivíduos com gineceu voltado para a esquerda e indivíduos com gineceu voltado para a direita (Barrett 2002).

Cerca de nove ordens de angiospermas, sete Eudicotiledôneas (Fabales, Malpighiales, Myrtales, Dipsacales, Lamiales, Solanales e Gentianales) e duas monocotiledôneas (Asparagales e Commelinales) possuem espécies enantiostílicas, sendo 11 famílias, de Monocotiledôneas e Eudicotiledôneas, do tipo monomórfica e quatro famílias de monocotiledôneas e dicotiledôneas do tipo dimórfica (Barrett 2002; Bezerra 2008).

A subtribo Cassiinae (Fabaceae) apresenta um grande número de espécies enantiostílicas. Os gêneros *Cassia*, *Chamaecrista* e *Senna* vêm sendo caracterizadas em alguns estudos como enantiostílicas monomórficas (Dulberger 1981; Carvalho & Oliveira 2003; Liu & Koptur 2003; Ribeiro & Lovato 2004; Westerkamp 2004; Laporta 2005; Costa et al. 2007; Gómez 2008; Dutra 2009; Almeida et al. 2013a, b), mostrando um grande número de espécies autocompatíveis, o que parece ser uma tendência dentro da subtribo.

Apesar do conhecimento da enantiostilia não ser recente, pouco se sabe sobre a sua real funcionalidade (Barrett, Jesson & Baker 2000). A maior parte dos estudos aponta uma tendência comum das flores enantiostílicas favorecerem a transferência de pólen entre flores de morfos diferentes, por xenogamia (Tood 1822; Knuth 1906; Irwin & Barneby 1976) ou por geitonogamia (Dulberger 1981; Gottsberger & Silberbauer - Gottsberger 1988; Bahadur et al. 1990; Fenster 1995; Laporta 2005), devido à

coincidência na deposição e captura de pólen no corpo do polinizador por flores de morfos opostos. Por outro lado, Dulberger (1981) afirma que a enantioestilia surgiu com a finalidade de proteger o gineceu do processo de polinização por vibração, que poderia danificá-lo. Contudo, outros autores acreditam que são necessários mais estudos para definição da verdadeira funcionalidade da enantioestilia (Thorp & Estes 1975; Jesson & Barrett 2002).

Estudos envolvendo espécies da subtribo Cassiinae apontam a enantioestilia funcional na diminuição das taxas de autopolinização, da geitonogamia e aumento na taxa de xenogamia (Carvalho & Oliveira 2003; Westerkamp 2004; Costa et al. 2007; Gómez 2008; Almeida et al. 2013a).

A investigação da transferência efetiva dos grãos entre flores de morfos recíprocos em flores enantioestílicas são inexistentes, o que deve estar relacionado à ausência de grãos de pólen heteromorfos, contrariamente ao observado para espécies heterostílicas (Ganders 1979).

Em espécies enantioestílicas das famílias Solanaceae, Malpighiaceae e Vochysiaceae parece ocorrer um padrão na deposição e captação de pólen no corpo dos polinizadores (Jesson & Barrett 2002; Bezerra 2008; Kriek 2008). Nessas espécies as anteras se apresentam no lado oposto ao gineceu, ocasionando a deposição direta de pólen no local inverso ao da captação, o que também ocorre para algumas espécies de Cassiinae (Laporta 2005). Por outro lado, alguns estudos mostram espécies de Cassiinae com mecanismos de deposição indireta de pólen no corpo dos visitantes (Delgado & Souza 1997; Gottsberger & Silberbauer-Gottsberger 1988; Westerkamp 2004; Costa 2007; Dutra 2009). Nesses casos, outras estruturas da flor, como as pétalas, participam desse processo. Westerkamp (2004) observou mecanismos de polinização indireta em espécies do gênero *Cassia*. Segundo o autor, o pólen era depositado no corpo do polinizador através do processo de ricochete. Essa deposição se dava pelas leis de incidência da luz, onde o ângulo de incidência é igual ao ângulo de reflexão. Com a ajuda da vibração exercida pelos visitantes, os grãos são liberados pelas anteras e direcionados pelas pétalas para locais específicos do dorso dos visitantes. Almeida e colaboradores (2013), estudando *Chamaecrista ramosa* verificaram a ocorrência de um mecanismo semelhante, mas neste caso foi definido como processo de “looping”, já que os grãos de pólen percorriam as pétalas exercendo um movimento circular.

Devido a essa dependência da presença do morfo recíproco para o sucesso na formação de frutos, alguns estudos analisaram a proporção dos morfos florais em espécies enantiostílicas monomórficas e dimórficas (Carvalho & Oliveira 2003; Tang & Huang 2005; Gómez 2008; Almeida et al. 2013a; b). Os resultados encontrados mostram proporção semelhante entre os morfos (isoplezia), o que também é encontrado para espécies heterostílicas, outro mecanismo de hercogamia recíproca.

Desvios nesse padrão hercogâmico recíproco vêm sendo relatados para espécies heterostílicas, sendo essas espécies classificadas como variantes ou atípicas (Sobrevila et al. 1983; Hamilton 1990; Richards & Koptur 1993; Barrett 2002). Nesses casos, essas espécies podem vir a apresentar características que diferem da heterostilia típica, como ausência da proporção esperada dos morfos, presença de um terceiro morfo ou ausência de um dos morfos, quebra da auto-incompatibilidade intramorfo ocorrente em espécies heterostílicas, entre outras (Sobrevila et al. 1983; Hamilton 1990; Richards & Koptur 1993; Barrett 2002). Para espécies heterostílicas, estes aspectos vêm sendo mostrados como possíveis resultados de perturbações ambientais, pouca eficiência dos polinizadores ou ausência dos mesmos (Barrett 2002).

Já em espécies enantiostílicas um padrão que tem sido observado em alguns estudos (Delgado & Souza 1997; Gottsberger & Silberbauer-Gottsberger 1988; Westerkamp 2004; Laporta 2005; Costa 2007; Bezerra 2008; Gómez 2008; Kriek 2008; Dutra 2009) envolve características como presença de morfos recíprocos, proporção desses morfos na população, ausência de mecanismos de incompatibilidade intramorfo e deposição e captação de pólen em lados opostos no corpo do polinizador. Apesar da existência desse padrão, apenas Almeida e colaboradores (2013b), estudando *Chamaecrista flexuosa*, relataram desvios do padrão enantiostílico pela presença de um terceiro morfo (Central), ausência de deposição e captação em lados opostos do corpo do polinizador e ausência da proporção dos morfos na população, o que, segundo os autores, trouxe mudanças na funcionalidade desse mecanismo. Sendo assim, é possível a ocorrência desses desvios para outras espécies enantiostílicas.

Investigações dos mecanismos da enantiostilia acerca da relação com o polinizador são escassos. A maioria dos estudos realizados até o momento utiliza a interpretação da morfologia floral como base para o estabelecimento de padrões de transferência do pólen nestas espécies, além de não relacionarem a presença de

diferenças peculiares na morfologia com mecanismos de isolamento reprodutivo entre as espécies da subtribo Cassiinae.

Este estudo avaliou a biologia reprodutiva de espécies da subtribo Cassiinae com ênfase na investigação da funcionalidade da enantioestilia e suas relações reprodutivas.

2. Revisão bibliográfica

2.1 Enantioestilia

Além das formas de enantioestilia já citadas, em relação ao posicionamento das estruturas reprodutivas masculinas as espécies enantioestílicas podem ser classificadas em recíprocas, quando os estames ocorrem em posição inversa nos morfos florais e não recíprocas quando o posicionamento dos estames não é alterado, independente do posicionamento do gineceu (Jesson & Barrett 2003).

Cerca de 14 famílias de Angiospermas possuem espécies enantioestílicas, sendo 10 famílias de Monocotiledôneas e Eudicotiledôneas do tipo monomórfica e quatro famílias de Monocotiledôneas e Eudicotiledôneas do tipo dimórfica (Barrett 2002; Bezerra 2008).

Apesar do conhecimento da enantioestilia não ser recente, pouco se sabe sobre a sua real funcionalidade. Estudos recentes têm tentado mostrar o porquê da existência de flores enantioestílicas (Barrett, Jesson & Baker 2000). A maior parte dos quais aponta para uma tendência comum das flores enantioestílicas em favorecer a transferência de pólen entre flores de morfos diferentes, por xenogamia (Tood 1822; Knuth 1906; Irwin & Barneby 1976; Almeida et al. 2013a) ou por geitonogamia (Dulberger 1981; Gottsberger & Silberbauer-Gottsberger 1988; Bahadur et al. 1990; Fenster 1995; Laporta 2005). Flores com o gineceu voltado para a direita captam pólen do lado direito e depositam pólen no lado esquerdo dos polinizadores, e flores com o gineceu voltado para a esquerda captam pólen do lado esquerdo e depositam pólen no lado direito do polinizador (Bahadur et al. 1990). Por outro lado, Dulberger (1981) afirma que a enantioestilia surgiu com a finalidade de proteger o gineceu do processo de polinização por vibração exercido pelas abelhas visitantes, que poderia danificá-lo devido à fragilidade dessa estrutura. Em estudo recente, Almeida e colaboradores (2013b), reportou a presença da enantioestilia em *Chamaecrista flexuosa* na qual esta característica parecia contribuir com uma maior eficiência na captação do pólen em maior extensão do

corpo dos visitantes. Contudo, outros autores acreditam que são necessários mais estudos para definição da verdadeira funcionalidade da enantioestilia (Thorp & Estes 1975; Jesson & Barrett 2002).

2.2 Genética e evolução da enantioestilia

Pouco se conhece das características genéticas de espécies enantioestílicas (Barrett 2010). Em estudo com a espécie enantioestílica dimórfica *Heteranthera multiflora* (Pontederiaceae), Jesson e Barrett (2002b) verificaram que a enantioestilia, neste caso, é controlada por um único par de alelos, sendo o carácter deflexão para esquerda dominante sobre deflexão para a direita. Contudo, a genética envolvida na expressão dos morfos florais para espécies enantioestílicas monomórficas é desconhecida (Jesson & Barrett 2002b; Barrett 2010).

Até o estudo realizado por Jesson e colaboradores (2003) e Jesson e Barrett (2003), a evolução da enantioestilia permanecia um mistério, principalmente quando se tratava do tipo monomórfico. A enantioestilia dimórfica parecia facilmente explicável, já que as taxas de autogamia e geitonogamia seriam reduzidas na transição do tipo monomórfico para o dimórfico, atuando como pressão seletiva para esta mudança (Barrett 2010). Esta transição se assemelharia ao ocorrido com espécies dióicas que teriam evoluído a partir de espécies monóicas, apenas fixando um dos morfos em determinados indivíduos (Barrett 2010). Para as enantioestílicas monomórficas as evidências de uma transição a partir de espécies com estilete central chegaram com os estudos de Jesson e Barrett (2002; 2003; 2005) e Jesson e colaboradores (2003). Nestes estudos teóricos e experimentais os pesquisadores verificaram reduções nas taxas de autogamia e geitonogamia, e elevação da xenogamia em espécies enantioestílicas monomórficas quando comparadas a espécies de estilete central, sendo plausível a aplicação da teoria da transição utilizada para a transição monomórfica-dimórfica.

2.3 Enantioestilia em espécies de *Cassiinae*

Os gêneros *Cassia* L., *Chamaecrista* Moench e *Senna* Mill. estão subordinados à subtribo *Cassiinae* Irwin & Barneby (inclusa na tribo *Cassieae* Bronn) (Irwin & Barneby 1982). As espécies destes três gêneros eram incluídas em *Cassia* L. até o tratamento taxonômico de Irwin & Barneby (1976), quando estes gêneros foram separados.

Muitas espécies da subtribo Cassiinae vêm sendo relatadas como enantiostílicas em diversos estudos acerca da biologia reprodutiva (Carvalho & Oliveira 2003; Ribeiro & Lovato 2004; Laporta 2005; Urrutia & Hokche 2008; Torres 2009), investigação do mecanismo (Todd 1882; Delgado & Souza 1977; Gottsberger et al. 1988; Gottsberger & Silberbauer-Gottsberger 1988; Westerkamp 2004; Almeida et al. 2013a,b) e observação de visitantes florais (Nascimento & Del-Claro 2007; Oliveira-Rebouças & Gimenes 2011).

Westerkamp (2004), em estudo espécies do gênero *Cassia*, descreveu o mecanismo do “ricochete”, no qual os grãos de pólen eram depositados no dorso do polinizador, com auxílio da pétala, essa deposição se dava pelas leis de incidência da luz, onde o ângulo de incidência é igual ao ângulo de reflexão. Todd (1882) estudando *Chamaecrista fasciculata*, Delgado e Souza (1977) pesquisando *Senna multijuga*, Gottsberger e colaboradores (1988) *Chamaecrista hispidula* e Almeida e colaboradores (2013a) *Chamaecrista ramosa*, descreveram mecanismos semelhantes para essas espécies, sempre relacionando o papel de uma das pétalas na deposição desses grãos em locais específicos do corpo dos polinizadores.

A maioria desses estudos relacionou a existência da enantiostilia ao aumento nas taxas de xenogamia (Carvalho & Oliveira 2003; Almeida et al. 2013a), e nas taxas de geitonogamia (Laporta 2005; Torres 2009; Almeida et al. 2013a,b). Almeida e colaboradores (2013b) atribuiu a presença da enantiostilia a uma maior eficiência na captação dos grãos de pólen no corpo do polinizador. Contudo, Westerkamp (2004) afirmou que as funções atribuídas a enantiostilia para outros grupos, como aumento das taxas de polinização cruzada, não podem ser atribuídas às espécies de Cassiinae, já que várias flores dos dois morfos encontram-se abertas simultaneamente num mesmo indivíduo, mantendo as taxas de autogamia elevadas, e a proteção ao gineceu no momento da vibração também não teria validade, pois estas flores já são adaptadas a esse processo.

2.4 *Hercogamia recíproca x isopleitia*

A proporção semelhante no número de morfos florais recíprocos na população é denominada isopleitia (Ganders 1979; Barrett 1992). Esta estratégia é essencial para o sucesso reprodutivo das espécies hercogâmicas recíprocas, pela necessidade do cruzamento intermorfo (Barrett 2002).

Estudos apontam a tendência da ocorrência da isopletia em espécies enantiostílicas monomórficas (Jesson & Barrett 2003; Tang & Huang 2005; Almeida et al. 2013a; Almeida et al. 2013b), dimórficas (Ornduff 1974), heterostílicas (Riveros et al. 1995; Ree 1997; Pailler e Thompson 1997; Teixeira & Machado 2004; Pereira & Barbosa 2006; Lenza et al. 2008) e flexistílicas (Li et al. 2001).

Acompanhando a floração das espécies enantiostílicas monomórficas *Monochoria korsakowii* e *M. vaginalis* (Pontederiaceae), Tang & Huang (2005) verificaram a ocorrência de isopletia nas populações. O mesmo ocorreu para as espécies da subtribo Cassiinae, *Chamaecrista ramosa* e *C. flexuosa* em estudo desenvolvido por Almeida e colaboradores (2013a,b).

Alguns estudos registraram populações não isopléticas (ou anisopléticas) em espécies heterostílicas (Riveros et al. 1995; Pailler & Thompson 1997; Teixeira & Machado 2004; Pereira & Barbosa 2006), sendo este desequilíbrio atribuído a mecanismos de resposta a perturbações ambientais (Sobrevila et al. 1983; Hamilton 1990; Barrett 1992; Richards & Koptur 1993; Barrett 2002). Para espécies inversostílicas, outro tipo de hercogamia recíproca, Pauw (2005) verificou a ocorrência da anisopletia nas populações estudadas. Até onde temos conhecimento, não existem registros de anisopletia em espécies enantiostílicas. Contudo, Almeida e colaboradores (2013b), quando analisaram as flores da espécie *Chamaecrista flexuosa* pelo parâmetro funcional, verificaram a ausência de isopletia, mas a análise morfológica mostrou o contrário.

2.5 Desvios do padrão hercogâmico recíproco

Alguns estudos com espécies heterostílicas mostram a ocorrência de uma possível “fuga” deste padrão, sendo tais espécies denominadas variantes ou atípicas (Sobrevila et al. 1983; Hamilton 1990; Barrett 1992; Richards & Koptur 1993). Para esses autores os desvios estão relacionados a perturbações ambientais, tais como ausência ou ineficiência dos serviços de polinização ou perda de um dos morfos na população (Barrett 2002). Estas variações ou desvios resultam em perda do sistema de incompatibilidade intramorfo, homostilia, ou seja, ausência de indivíduos recíprocos na população e ausência de equilíbrio na proporção de 1:1 de indivíduos dos dois morfos (Sobrevila et al. 1983; Hamilton 1990; Barrett 1992; Richards & Koptur 1993).

Para espécies enantiofílicas, apenas Almeida e colaboradores (2013b) relatou a ocorrência de desvios ocorrentes em *Chamaecrista flexuosa*, que apresentou um terceiro morfo (central) e ausência da proporção de 1:1 de morfos na população, o que segundo o autor trouxe mudanças na funcionalidade desse mecanismo, aumentando a amplitude de captação do pólen, pelo estigma, no corpo dos polinizadores. Sendo assim, presume-se que é possível a ocorrência desses desvios para outras espécies enantiofílicas.

2.6 Polinização por vibração X Cassiinae

Cerca de 15.000 a 20.000 espécies de Angiospermas apresentam flores com anteras poricidas (Buchmann 1983). As famílias Fabaceae (Cassiinae), Solanaceae, Melastomataceae e Ochnaceae abrigam espécies com este tipo de deiscência e geralmente não possuem nectários (Buchmann 1983; Nadia & Machado 2005). Estas espécies, denominadas flores de pólen (Vogel 1978), são polinizadas exclusivamente por abelhas fêmeas (uma vez que os machos não utilizam este recurso), principalmente dos gêneros *Xylocopa* e *Bombus*, que vibram suas anteras através de um comportamento chamado de polinização por vibração ou “buzz - pollination”. Estes movimentos de vibração são provocadas por contrações da musculatura alar das abelhas, promovendo a adesão do pólen à região ventral do mesossoma dos visitantes, sendo posteriormente transferido para a escopa (Buchmann 1983). Estudos mostram que a ocorrência de forças eletrostáticas no momento da vibração favorece esta adesão dos grãos ao corpo dos polinizadores (Erickson 1975; Thorp 1979; Corbert et al. 1982; Erickson & Buchman 1983).

De acordo com o comportamento, as abelhas que visitam flores de pólen são classificadas em três categorias: vibradoras, representadas pelas abelhas que realmente transmitem vibrações para as anteras, promovendo a liberação do pólen para poder coletar pólen; mordedoras, representadas por abelhas que danificam as anteras, mastigando-as, para coletar o pólen; coletoras, representadas por aquelas abelhas que recolhem o pólen que se encontra na superfície da flor após esta ter sido vibrada, e com a subcategoria espremedoras (“milking”) (Wille 1963; Buchmann et al. 1977; Michener 1962; Bezerra & Machado 2003; Nadia & Machado 2005).

Nas espécies da subtribo Cassiinae, de maneira geral, e nos gêneros *Chamaecrista* Moench e *Senna* Mill., em especial, as flores apresentam anteras de deiscência poricida, dependendo exclusivamente de abelhas capazes de vibrar os

estames para a liberação do pólen (Buchmann 1983; Gottsberger & Silberbauer - Gottsberger 1988). De acordo com Westerkamp (2004), nestes gêneros existe uma separação do pólen utilizado para polinização daquele coletado pelas fêmeas para provisão larval, devido à presença de anteras morfologicamente distintas. Estes polinizadores são geralmente abelhas grandes, com alto grau de especialização (Forni-Martins et al. 1998; Frankie et al. 1983) que conseguem “abraçar” as peças florais e realizar vibrações (Gottsberger & Silberbauer-Gottsberger 1988). Desta maneira, estas abelhas especializadas, geralmente solitárias, possuem papel importante na manutenção das espécies vegetais (Schlindwein 2000).

2.7 Visitantes florais em espécies de *Cassiinae*

Devido à ocorrência marcante de flores de pólen nas espécies representantes da subtribo *Cassiinae*, estudos relatam a relação destas espécies com abelhas especialistas capazes de vibrar suas anteras para a retirada dos grãos de pólen (Carvalho & Oliveira 2003; Ribeiro & Lovato 2004; Westerkamp 2004; Laporta 2005; Nascimento & Del-Claro 2007; Torres 2009; Gómez et al. 2010; Oliveira-Rebouças & Gimenes 2011; Almeida et al. 2013a; Almeida et al. 2013b).

Torres (2009) estudando a espécie *Senna multijuga*, observou espécies de abelhas dos gêneros *Euglossa*, *Epicharis*, *Centris*, *Xylocopa*, *Melipona* e *Bombus* visitando as suas flores, onde a maioria das espécies com exceção das dos gêneros *Euglossa*, *Melipona* e a espécie *Xylocopa subcyanea*, apresentaram-se como polinizadoras.

Outros estudos observaram que o comportamento do visitante (polinizador ou pilhador) está relacionado na maioria dos casos ao seu tamanho corporal, pois abelhas pequenas no momento da visita devido ao seu tamanho, não contatam as estruturas reprodutivas (Laporta 2005; Almeida 2012; Almeida et al. 2013a).

Nascimento e Del-Claro (2007) verificaram que espécies de abelhas de pequeno porte como *Paratrigona lineata*, *Trigona hyalinata*, *Tetragona clavipes*, *Hylaeus* sp., *Pseudaugochlora* sp. e *Pseudaugochlora graminea* apenas pilhavam pólen das flores de *Chamaecrista debilis* enquanto *Bombus morio*, *Eulaema nigrita*, *Centris (Melacentris)*, *Centris tarsata* e *Xylocopa muscaria*, abelhas de grande porte, apresentaram-se como polinizadoras.

Em estudo envolvendo as espécies *Chamaecrista ramosa* e *C. flexuosa*, Almeida e colaboradores (2013a; b) verificaram que espécies do gênero *Xylocopa* foram os principais polinizadoras e espécies do gênero *Augochlora* como pilhadoras.

Diversos estudos também relatam a ocorrência de abelhas de grande porte como polinizadoras de espécies de Cassiinae como, por exemplo, *Chamaecrista debilis* era polinizada por *Bombus morio*, *Centris tarsata* e *Centris* (Melacentris), já as espécies *Chamaecrista belemii*, *C. nictitans*, *C. pascuorum*, *C. cipoana*, *C. papillata* e *C. racemosa* foram todas visitadas por espécies do gênero *Centris* (Aguiar et al. 2003; Nascimento 2006).

Para as espécies *Senna sylvestris*, *S. macranthera* e *S. corymbosa* predominam como visitantes espécies dos gêneros *Xylocopa*, *Bombus* e *Centris*, abelhas de grande porte (Carvalho & Oliveira 2003; Laporta 2005; Almeida 2012). Almeida (2012) observou que o resultado da visita variou de polinizador para pilhador quando estas abelhas apresentavam pequeno porte, sendo incapazes de exercer a transferência de grãos de pólen de forma efetiva.

2.8 Sistemas reprodutivos na subtribo Cassiinae

São poucos os trabalhos relacionados ao sistema reprodutivo das espécies da subtribo Cassiinae. Segundo Arroyo (1981), mecanismos de autoincompatibilidade gametofítica são comuns na subfamília Caesalpinioideae. Devido ao tipo de estigma úmido, esse mecanismo foi inferido para espécies de Cassiinae (Owens & Lewis 1989). Contudo, Arroyo (1981) afirma que o mecanismo de incompatibilidade proposto para a subfamília foi perdido por vários representantes herbáceos anuais do grupo, sendo mais comum a ocorrência em representantes de maior porte.

Para esse grupo a autoincompatibilidade gametofítica foi descrito como o mais ocorrente (Arroyo 1981), porém alguns estudos vêm reportando a ocorrência de mecanismos de incompatibilidade de ação tardia (Seavey & Bawa 1986, Gibbs 1990, Gibbs et al. 1999, Lewis & Gibbs 1999, Freitas & Oliveira 2002, Carvalho & Oliveira 2003, Rodriguez-Riãno et al. 2004, Oliveira & Sigrist 2008, Pires & Freitas 2008; Leite & Machado 2010). Ribeiro e Lovato (2004) sugerem que a mudança do mecanismo de autoincompatibilidade para o de autocompatibilidade em Cassiinae seria uma estratégia para a ocupação de novos habitats.

Estudos desenvolvidos com as espécies *Senna corymbosa*, *S. multijuga* e *S. australis*, foi detectada autocompatibilidade (Silva et al. 2002; Ribeiro & Lovato 2004; Laporta 2005). No entanto, *Senna sylvestris*, *S. martiana* e *S. spectabilis* mostraram-se autoincompatíveis (Carvalho & Oliveira 2003; Leite & Machado 2010). Um destaque para a subtribo é a ausência de agamospermia e autopolinização espontânea em todas as espécies estudadas (Silva et al. 2002; Carvalho & Oliveira 2003; Ribeiro & Lovato 2004; Laporta 2005; Leite & Machado 2010).

O gênero *Chamaecrista* também se mostra dependente dos polinizadores para a formação de frutos. Análises realizadas com as espécies *C. devauxii* var. *latistipula*, *C. devauxii* var. *gramínea*, *C. keyensis*, *C. ramosa* e *C. flexuosa* mostraram que todas são autocompatíveis, mas não formam frutos por autopolinização espontânea (Liu & Koptur 2003; Costa et al. 2007; Almeida et al. 2013a; Almeida et al. 2013b), diferindo do estudo realizado por Urrutia e Hokche (2008) com as espécies *C. nictitans* e *C. serpens* que mostraram-se autocompatíveis, formando frutos espontaneamente.

Dulberger (1981) descreveu autocompatibilidade para as espécies *Cassia didymotrya* e *Cassia auriculata*, que não formaram frutos por autopolinização manual e espontânea.

No geral, espécies representantes de Cassiinae apresentam sistemas reprodutivos variando de complexos a simples com espécies auto-incompatíveis de ação tardia e autocompatíveis (Silva et al. 2002; Carvalho & Oliveira 2003; Liu & Koptur 2003; Ribeiro & Lovato 2004; Laporta 2005; Costa et al. 2007; Urrutia & Hokche 2008; Leite & Machado 2010; Almeida et al. 2013a, b).

2.9 Conclusões

Espécies da subtribo Cassiinae apresentam um modo reprodutivo complexo, pela presença de mecanismo reprodutivo enantioestilia e da dependência de polinizadores especializados para o sucesso reprodutivo (Almeida et al. 2013a), e em alguns casos pela ocorrência de mecanismos de incompatibilidade (Carvalho & Oliveira 2003; Leite & Machado 2010). Sendo assim, estudos acerca da reprodução dessas espécies são imprescindíveis para o maior conhecimento da enantioestilia e suas relações reprodutivas, não só dos representantes deste grupo, mas também de outras espécies enantioestílicas.

2. Referências bibliográficas

- AGUIAR, C.M.L.; ZANELLA F.C.V.; MARTINS, C.F. & DE CARVALHO, C.A.L. 2003. Plantas Visitadas por *Centris* spp. (Hymenoptera: Apidae) na Caatinga para obtenção de recursos florais. *Neotropical Entomology* 32 (2): 247-259.
- ALMEIDA, N. M.; CASTRO, C. C.; LEITE, A. V.; NOVO, R. R. & MACHADO, I. C. 2013a. Enantiostyly in *Chamaecrista ramosa* (Fabaceae-Caesalpinioideae): floral morphology, pollen transfer dynamics and breeding system. *Plant Biology* 15: 369-375.
- ALMEIDA, N. M.; CASTRO, C. C.; LEITE, A. V.; NOVO, R. R. & MACHADO, I. C. 2013b. Floral polymorphism in *Chamaecrista flexuosa* (Fabaceae-Caesalpinioideae): a possible case of atypical enantiostyly? *Annals of Botany* 112 (6): 1117-1123.
- AYRES, M.; AYRES Jr., M.; AYRES, D.L. & SANTOS, A.S.S. 2007. *Biostat: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas*. Belém, Pará, Brasil.
- ARROYO, M.T.K. 1981. Breeding systems and pollination biology in Leguminosae. In *Advances in Legume Systematics* (R.M. Polhill & P.H. Raven, eds.) (Part 2). Royal Botanic Gardens, Kew, New York.
- BAHADUR, B; CHATUVERDI, A. & RAMA SWARY, N. 1990. S.E.M. studies of pollen in relation to enantiostyly and heteranthery in *Cassia* (Caesalpinaceae). *Current perspectives in Palynology Research. Journal of Palynology*: 7-22.
- BARRETT, S. C. H. 1992. Heterostylous genetic polymorphisms: model systems for evolutionary analysis. In: BARRETT, S.C.H. (ed) *Evolution and function of heterostyly*. Monographs on theoretical and applied genetics. Berlin: Springer-Verlag.
- BARRETT, S. C. H., JESSON, L. K. & BAKER, A. M. 2000. The evolution and function of stylar polymorphisms in flowering plants. *Annals of Botany* 85: 253–265.

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

BARRETT, S.C. H. 2010. Darwin's legacy: the forms, function and sexual diversity of flowers. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 365: 351–368

BEZERRA, E.L.S. 2008. Guilda de flores de óleo do Parque Nacional do Catimbau: fenologia, polinização e sistema reprodutivo. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

BORGES, M.S.; VIANA, B.F. & NEVES, E.L. 2002. Aspectos da estratégia reprodutiva de duas espécies co-ocorrentes de *Senna* (K.Bauhin) P.Miller (Caesalpiniaceae) nas dunas do médio rio São Francisco, Bahia. *Sitientibus Série Ciências Biológicas* 2 (1/2): 49-54.

BORTOLUZZI, R.L.C.; MIOTTO, S. T. S. & REIS, A. 2007. Novos registros de *Chamaecrista* Moench e *Senna* Mill. (Leguminosae-Caesalpinioideae-Cassieae) na flora sul-brasileira. *Iheringia, Série Botânica*, Porto Alegre, v. 62, n. 1-2, p. 121-130.

BUCHMAN, S. L. 1983. Buzz pollination in angiosperms. In *Handbook of Experimental Pollination* (C.E. Jones & R.J. Little, eds.). Van Nostrand Reinhold, New York, p.73-113.

CARVALHO, D. A., OLIVEIRA, P. E. 2003. Biologia reprodutiva e polinização de *Senna sylvestris* (Vell.) (Leguminosae-Caesalpinioideae). *Revista Brasileira de Botânica* 26: 319–328.

CONCEIÇÃO, A. DE S.; QUEIROZ, L. P. DE & BORBA, E. L. 2008. Natural hybrids in *Chamaecrista* sect. *Absus* subsect. *Baseophyllum* (Leguminosae-Caesalpinioideae): genetic and morphological evidence. *Plant Systematics and Evolution* 271: 19–27.

COSTA, C.B.N. 2007. Mecanismos de isolamento reprodutivo em espécies simpátricas: Biologia reprodutiva de *Chamaecrista* (Leguminosae-Caesalpinioideae) em Mucugê,

Bahia. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.

COSTA, C.B.N.; LAMBERT, S.M.; BORBA, E.L. & DE QUEIROZ, L.P. 2007. Postzygotic reproductive isolation between sympatric taxa in the *Chamaecrista desvauxii* complex (Leguminosae-Caesalpinioideae). *Annals of Botany* 99: 625–635.

CRESPO, M.B. 2003. The reproductive ecology of *Medicago citrina* (Font Quer) Greuter (Leguminosae): a bee-pollinated plant in mediterranean islands where bees are absent. *Plant Systematics and Evolution* 241: 29-46.

CRONQUIST, A. 1988. The evolution and classification of flowering plants. 2nd. ed. The New York Botanical Garden, Bronx, New York.

DELGADO, S. A. & SOUZA, S. M. 1997. Biologia floral do gênero *Cassia* em La region de Los Tuxtlas, Vera Cruz. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 37: 5-45.

DULBERGER, R. 1981. The floral biology of *Cassia didymobotrya* and *C. auriculata* (Caesalpinaceae). *American Journal of Botany* 68: 1350–1360.

DUTRA, V.F., VIEIRA, M.F, GARCIA, F.C.P. & LIMA, H.C. 2009. Fenologia reprodutiva, síndromes de polinização e dispersão em espécies de leguminosae dos campos rupestres do parque estadual do itacolomi, Minas Gerais, Brasil. *Rodriguésia* 60: 371-387.

ENDRESS, P.K. 1994. Diversity and evolutionary biology of tropical flowers. Cambridge University Press, Cambridge.

ERICKSON, E.H. & BUCHMANN, S.L. 1983. Electrostatics and pollination. Pp. 173-184. In: C.E. Jones & R.J. Little (eds.). *Handbook of experimental pollination biology*. Scientific and Academic Editions, New York.

FAEGRI, K. & VAN DER PIJL, L. 1979. The principles of pollination ecology. 3ed. Pergamon Press, London.

- FENSTER, C.B. 1995. Mirror image and their effect on outcrossing rate in *Chamaecrista fasciculata* (Leguminosae). *American Journal of Botany* 82: 46–50.
- FORNI-MARTINS, E.R.; MARQUES, M.C.M. & LEMES, M.R. 1998. Biologia Floral e Reprodução de *Solanum paniculatum* L. (Solanaceae) no Estado de São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 21(2): 117-124.
- FOURNIER, L.A. 1974. Un metodo cuantitativo para la medición de características fenológicas em árboles. *Turrialba* 24: 422-423.
- FRANKIE, G. W., HABER, W. A., OPLER, P. A. & BAWA, K. S. 1983. Characteristics and organization of the large bee pollination system in the Costa Rica dry forest. In: Jones, C. E. & Little, R. J. (eds.) *Handbook of experimental pollination biology*.
- FREITAS, B. M.; OLIVEIRA-FILHO, J. H. 2001. Criação racional de mamangavas para polinização em áreas agrícolas. Fortaleza: Banco do Nordeste.
- FREITAS, C.V. & OLIVEIRA, P.E. 2002. Biologia reprodutiva de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae, Caesalpinioideae). *Revista Brasileira de Botânica* 25(3): 311-321.
- GIBBS, P. 1990. Self-incompatibility in flowering plants: a neotropical perspective. *Revista Brasileira de Botânica* 13: 125-136.
- GOMES, A. P. S. 1999. Florística e fitossociologia da vegetação arbustiva subcaducifólia no município de Buíque-PE. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- GÓMEZ, G.A. 2008. Biología reproductiva de *Chamaecrista chamaecristoides* (Fabaceae), especie enantioestilica de las dunas costeras. Dissertação de mestrado, Instituto de Ecología, A.C., Xalapa.

- GOTTSBERGER, G. & SILBERBAUER-GOTTSBERGER, I. 1988. Evolution of flower structures and pollination in Neotropical Cassiinae (Caesalpinaceae) species. *Phyton* 28:293-320.
- GUNN, C.R.. 1984. Fruits and seeds of genera in the subfamily Mimosoideae (Fabaceae). United States Department of Agriculture Technical Bulletin Number 1681.
- HAMILTON, C. W. 1990. Variations on a distylous theme in Mesoamerican *Psychotria* subgenus *Psychotria* (Rubiaceae). *Memoirs of the New York Botanical Garden* 55: 65-75.
- HERENDEEN, P.S. 2001. Structural evolution in the Caesalpinioideae (Leguminosae). In: Herendeen PS, Bruneau A ed(s). *Advances in legume systematics: part 9*. Kew: Royal Botanic Gardens, Kew.
- IRWIN, H.S. & BARNEBY, R.C. 1976. Notes on the generic of *Chamaecrista* Moench (Leguminosae: Caesalpinioideae). *Brittonia* 28: 28 – 36.
- IRWIN, H.S. & BARNEBY, R.C. 1982. The American Cassiinae. *Memoirs of the New York Botanical Garden* 35: 1-918.
- JESSON, L.K. & BARRETT T, S.C.H. 2002a. Solving the puzzle of mirror-image flowers. *Nature* 417:707.
- JESSON, L. K. & BARRETT, S. C. H. 2002b. The genetics of mirror-image flowers. *Proceedings of the Royal Society of London B* 269: 1835–1839.
- JESSON, L. K. & BARRETT, S. C. H. 2002c. Enantiostyly in *Wachendorfia* (Haemodoraceae); the influence of reproductive systems on the maintenance of the polymorphism. *American Journal of Botany* 89: 253–263.
- JESSON, L.K., & BARRETT, S.C.H. 2003. The comparative biology of mirror-image flowers. *International Journal of Sciences* 164 (5 Suppl.): 237-249.

- JESSON, L. K., BARRETT, S. C. H. & DAY, T. 2003. A theoretical investigation of the evolution and maintenance of mirror image flowers. *American Naturalist* 161: 916–930.
- JESSON, L.K. & BARRETT, S.C. H. 2005. Experimental tests of the function of mirror-image flowers. *Biological Journal Linnean Society* 85: 167–179.
- KEARNS, C.A. & INOUE, D.W. 1993. Techniques for pollination biologists. University of Colorado Press, Niwot.
- KNUTH P. 1906. Handbook of flower pollination. Oxford: Clarendon Press.
- KREBS, C.J. 1989. Ecological Methodology. New York: Harper and Row Publishers.
- KRIECK, C.; FINATTO, T.; MÜLLER, T.S.; GUERRA, M.P. & ORTH, A.I. 2008. Biologia reprodutiva de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L.Burtt & R.M.Sm. (Zingiberaceae) em Florianópolis, Santa Catarina *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 10 (2): 103-110.
- LAPORTA, C. 2005. Floral biology and reproductive system of enantiostylous *Senna corymbosa* (Caesalpinaceae). *Revista de Biologia Tropical* 53 (1-2): 49-61.
- LEITE, A.V. & MACHADO, I.C. 2010. Reproductive biology of woody species in Caatinga, a dry forest of northeastern Brazil. *Journal of Arid Environments*. 74: 1374-1380.
- LEWIS, G.P. 1987. Legumes of Bahia. Royal Botanic Gardens, Kew.
- LEWIS, G. & GIBBS, P. 1999. Reproductive biology of *Caesalpinia calycina* and *C.pluviosa* (Leguminosae) of the caatinga of north-eastern Brazil. *Plant Systematics and Evolution* 217: 43-53.
- LEWIS, G. P.; POLHILL, R. M. 1998. A situação atual da sistemática de Leguminosae neotropicais. In: Congresso Latinoamericano de Botânica, 6., 1994. Mar del Plata. Proceedings... St. Louis: Missouri Botanical Garden Press: 113-145.

- LEWIS, G.P.; SCHRIRE, B; MSCKINDER, B. & LOCK, M.. 2005. Legumes of the world. Kew: Royal Botanic Gardens.
- LIMA, H.C. 2000. Leguminosas arbóreas da Mata Atlântica. Tese (Doutorado em Ecologia) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Botânica. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- LIU, H & KOPTUR, S. 2003. Breeding system and pollination of a narrowly endemic herb of the Lower Florida Keys: impacts of the urban–wildland interface. *American Journal of Botany* 90: 1180–1187.
- LI, QING-JUN, XU, ZAI-FU, KRESS, J. W., XIA, YONG-MEI, ZHANG, LING, DENG, XIAO-BAO, GAO, JIANG-YUN & BAI, ZHI-LIN. 2001. Flexible style that encourages outcrossing. *Nature* 410: 432 .
- MAÊDA, J.M. 1985. Manual para uso da câmara de Neubauer para contagem de pólen em espécies florestais. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Departamento de Silvicultura, Seropédica.
- MARTIN, F.W. 1959. Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. *Stain Technol* 34: 125-128.
- NASCIMENTO, E. A. 2006. História natural e ecologia da interação entre *Chamaecrista debilis* (Vogel) Irwin & Barneby (Caesalpinaceae), herbívoros e formigas visitantes de nectários extraflorais no cerrado. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Filosofia, Ciência e Letras de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto.
- NASCIMENTO, E. DEL-CLARO, K. 2007. Floral visitors of *Chamaecrista debilis* (Vogel) IRWIN & BARNEBY (Fabaceae – Caesalpinoida) at cerrada of estação ecológica de Jataí, São Paulo State, Brasil. *Neotropical Entomology* 36 (4): 619- 624.

- NETO, O.C; LOPES, A.C. & MACHADO, I.C. 2007. Ecologia da Polinização de *Inga striata* Benth. (Leguminosae-Mimosoideae) em um remanescente de Mata Atlântica no Nordeste do Brasil. *Revista Brasileira de Biociências* 5 (1): 570-572.
- OLIVEIRA, M.I.B. & SIGRIST, M.R. 2008. Fenologia reprodutiva, polinização e reprodução de *Dipterix alata* Vogel (Leguminosae-Papilionoideae) em Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 31(2): 195-207.
- OLIVEIRA-REBOUÇAS, P. & GIMENES, M. 2011. Potential pollinators of *Comolia ovalifolia* DC Triana (Melastomataceae) and *Chamaecrista ramosa* (Vog.) H.S. Irwin and Barneby var. *ramosa* (Leguminosae-Caesalpinioideae). *Brazilian Journal Biology* 71 (2): 343-351
- OWENS, S.J. & LEWIS, G.P. 1989. Taxonomic and functional implications of stigma morphology in species of *Cassia*, *Chamaecrista*, and *Senna* (Leguminosae: Caesalpinioideae). *Plant Systematics and Evolution* 163: 93-105.
- RIBEIRO, R.A. AND LOVATO, M.B. 2004. Mating system in a neotropical tree species, *Senna multijuga* (Fabaceae). *Genetics Molecular Biology* 27 (3): 418-424.
- PIRES, J.P.A. & FREITAS, L. 2008. Reproductive biology of two tree species of Leguminosae in a Montane Rain Forest in Southeastern Brazil. *Flora (Jena)* 203: 491-498.
- RADFORD, A. E.; DICKINSON, W. C.; MASSEY, J. R. & BELL, C. R. 1974. *Vascular plant systematics*. Harper & Row publishers. New York.
- RANDELL, B. R. & BARLOW, B. A. 1998. *Senna*. *Flora of Australia* 12: 89-138.
- RIBEIRO, R.A. AND LOVATO, M.B. 2004. Mating system in a neotropical tree species, *Senna multijuga* (Fabaceae). *Genetics Molecular Biology* 27 (3): 418-424.
- RICHARDS, J. H.; KOPTUR, S. 1993. Floral variation and distyly in *Guettarda scabra* (Rubiaceae). *American Journal of Botany* 80 (1): 31-40.

- RODAL, M. J. N., ANDRADE, K.V.A., SALES, M. F. E GOMES, A. P. S. 1998. Fitossociologia do componente lenhoso de um refúgio vegetacional no município de Buíque, Pernambuco. *Revista Brasileira de Biologia* 58: 517-526.
- RODRIGUEZ-RIAÑO, T., ORTEGA-OLIVENCIA, A. & DEVESA, J.A. 1999. Reproductive biology in two Genisteae (Papilionoideae) endemic of the western Mediterranean region: *Cytisus striatus* and *Retama sphaerocarpa*. *Canadian Journal of Botany* 77: 809-820.
- SALES, M.F.; MAYO, S.J. & RODAL, M.J.N. 1998. Plantas Vasculares das Florestas Serranas de Pernambuco: Um check list da flora ameaçada dos Brejos de altitude, Pernambuco-Brasil. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- SCHLINDWEIN, C. 2000. A importância de abelhas especializadas na polinização de plantas nativas e conservação do meio ambiente. *Anais do Encontro sobre Abelhas* 4: 131-141.
- SEAVEY, S.R & BAWA, K.S. 1986. Late-acting self-incompatibility in Angiosperms. *Botanical Review* 52: 195-219.
- SILVA, A.L.G., ORMOND, W.T., PINHEIRO, M.C.B. 2002. Biologia floral e reprodutiva de *Senna australis* (Vell.) Irwin & Barneby (Fabaceae, Caesalpinioideae). *Boletim do Museu Nacional* 121: 1-11.
- SOBREVILA, C, RAMIREZ, N.; ENRECH, N. X. 1983. Reproductive biology of *Palicourea fendleri* and *P. petiolares* (Rubiaceae), heterostylous shrubs of a tropical cloud forest in Venezuela. *Biotropica* 15 (3): 161-169.
- SOUZA, V.C. & LORENZI, H. 2005. *Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II*. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum.

- SUDENE. 1990. Dados pluviométricos do Nordeste – Pernambuco. Série pluviométrica. Superintendência para o Desenvolvimento do Nordeste, Recife.
- THORP, R.W.& ESTES, J.R. 1975. Intrafloral behavior of bees on flowers of *Cassia fasciculata*. Journal of the Kansas Entomological Society 48:175-184.
- TODD, J.E. 1882. On the flowers of *Solanum rostratum* and *Cassia chamaecrista*. American Naturalist 16: 281– 287.
- TORRES, M.W. 2009. Biologia reprodutiva e polinização de *Senna multijuga* no Parque Nacional de Itatiaia e na Área de Proteção Ambiental da Serrinha do Alambari. Dissertação de Mestrado, Escola Nacional de Botânica Tropical, Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- URUTIA, E. & HOKCHE, O. 2008. Aspectos de la biologia reproductiva de dos especies de *Chamaecrista* Moench (Caesalpinioideae – Leguminosae). Acta bot. Venez. 31 (2): 461-472.
- VIANA, V. M. & PINHEIRO, L. A. F. V. 1998. Conservação da biodiversidade em fragmentos florestais. Série Técnica IPEF 12 (32): 25-42.
- WESTERKAMP, C. 2004. Ricochet pollination in Cassias – and how bees explain enantiostyly. In: Magalhães FB, Pereira JO, eds. Solitary bees: conservation, rearing and management for pollination. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará.
- VOGEL S. 1978. Evolutionary shifts from reward to deception in pollen flowers. In The pollination of flowers by insects (A.J. Richards, ed.). Academic Press, London.
- VOGEL, S. 1990. The role of scent glands in pollination. A.A. Balkema, Rotterdam.

4. Capítulo 1

Dinâmica de produção de morfos florais por espécies enantiofilicas da subtribo Cassiinae (Fabaceae-Caesalpinioideae) em uma área de caatinga no nordeste do Brasil

Manuscrito a ser enviado ao periódico Plant Biology

**Dinâmica de produção de morfos florais por espécies enantiostílicas da subtribo
Cassiinae (Fabaceae-Caesalpinioideae) em uma área de caatinga no nordeste do
Brasil**

Natan Messias de Almeida¹; José Alves de Siqueira Filho²; Paulo Eugênio de Oliveira³
& Cibele Cardoso de Castro⁴

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

²Universidade Federal do Vale do São Francisco, Rodovia BR 407, 12 Lote 543, Projeto
de Irrigação Nilo Coelho, s/n, C1, Petrolina, PE, Brasil, 56300-000.

³Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia, Av. Pará, 1720, Umuarama,
Uberlândia, MG, Brasil, 38405-382.

⁴Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Avenida Bom Pastor, s/n, Boa Vista, Garanhuns, PE, Brasil, 55292-270.

Título resumido: Dinâmica de produção de morfos florais em espécies enantiostílicas

Autor para correspondência: cibelegastro@hotmail.com

Resumo

Na enantioestilia, as flores apresentam reciprocidade devido ao posicionamento do estilete para direita ou esquerda. Um importante fator que favorece a polinização intermorfo é a isopletia. Espécies enantioestílicas monomórficas produzem flores direitas e esquerdas no mesmo indivíduo, e podem apresentar dinâmicas distintas na produção de morfos florais, caracterizando diferentes estratégias de reprodução, as quais aparentemente reduzem a geitonogamia. No presente estudo objetivou-se compreender a dinâmica de produção de morfos florais em sete espécies e uma variedade enantioestílicas de *Senna* e *Chamaecrista* em uma área de caatinga no nordeste do Brasil. O número diário de morfos florais produzido por indivíduo/espécie foi avaliado durante sete dias consecutivos. Os indivíduos foram classificados em funcionalmente direitos (FD), funcionalmente esquerdos (FE) e funcionalmente recíprocos (REC), foram incluídos em categorias de repetição de 1 a 6. Todas as populações apresentaram-se isopléticas no número diário e total de flores. Seis espécies apresentaram indivíduos FD, FE e REC, e maior número de eventos nas categorias baixas de repetição. A isopletia é esperada para espécies enantioestílicas, bem como a pequena produção de flores, mas ocorrência de diferentes categorias funcionais nunca havia sido relatada. As diferentes estratégias na dinâmica de floração minimizam as taxas de geitonogamia e elevam a xenogamia em espécies enantioestílicas monomórficas.

Palavras-chave: categorias de repetição, enantioestilia monomórfica, isopletia, geitonogamia, xenogamia.

Introdução

A enantioestilia é um dimorfismo floral no qual dois tipos de flores (direitas-D e esquerdas-E) diferem reciprocamente quanto ao posicionamento do estilete em relação ao eixo floral (à direita ou à esquerda; Barrett 2002). Como o androceu ocupa posição oposta ao gineceu, tal reciprocidade resulta na deposição e na captação do pólen dos tipos florais (ou morfos florais) em locais diferentes do corpo do polinizador, favorecendo a polinização entre eles (Bahadur *et al.* 1990; Barrett 1992; Kohn *et al.* 1996; Barrett 2002). Os cruzamentos entre morfos florais são maximizados pela geralmente observada proporção semelhante dos mesmos na população (isopleτία) (Barrett 1992).

Um importante fator que influencia as taxas de cruzamentos entre flores D e E é sua distribuição no indivíduo: se são produzidas em uma mesma planta (espécies enantioestílicas monomórficas) ou se um indivíduo produz apenas um morfo floral (dimórficas; Barrett 2002). Devido à presença dos dois morfos florais em um mesmo indivíduo, a enantioestilia monomórfica é considerada uma estratégia que favorece a geitonogamia (Barrett *et al.* 2000; Almeida *et al.* 2013a; Almeida *et al.* 2013b). Este tipo de cruzamento pode levar à depressão endogâmica e à limitação polínica (Lloyd 1992; Harder & Barrett 1995), uma vez que geneticamente é semelhante à autogamia (Bawa 1974).

Algumas espécies enantioestílicas monomórficas possuem dinâmicas de produção de morfos florais que aparentemente minimizam as chances de geitonogamia. Uma delas é a separação temporal na produção de morfos florais, na qual os indivíduos produzem flores dos morfos D e E em dias diferentes, tornando-se funcionalmente dimórficos. Não havendo produção dos dois morfos no mesmo dia no mesmo indivíduo, as chances de geitonogamia tornam-se mínimas (Barrett *et al.* 2000). Outra estratégia é a produção de um número reduzido de flores por dia, geralmente de um mesmo morfo, o que favorece a polinização entre indivíduos (Barrett *et al.* 2000; Tang & Huang 2005; Almeida *et al.* 2013b).

Os poucos estudos relacionados à produção de morfos florais em espécies enantioestílicas investigaram espécies monomórficas e registraram isopleτία em espécies da tribo Cassiinae da família Fabaceae (Almeida *et al.* 2013a; Almeida *et al.* 2013b) e de espécies de Pontederiaceae (Tang & Huang 2005). A isopleτία é também uma tendência observada em espécies que possuem outros tipos de hercogamia recíproca,

tais como a heterostilia (Ree 1997; Pereira & Barbosa 2006; Lenza *et al.* 2008), a flexistilia (Li *et al.* 2001) e a inversostilia (Pauw 2005). Há ainda registros de populações não isopléticas (ou anisopléticas) em espécies heterostílicas (Riveros *et al.* 1995; Pailler & Thompson 1997; Teixeira & Machado 2004; Pereira & Barbosa 2006), sendo este desequilíbrio atribuído a mecanismos de resposta a perturbações ambientais (Sobrevila *et al.* 1983; Hamilton 1990; Barrett 1992; Richards & Koptur 1993; Barrett 2002). Até onde temos conhecimento, não existem registros de anisopleia em espécies enantiostílicas. Contudo, Almeida e colaboradores (2013b), quando analisaram as flores da espécie *Chamaecrista flexuosa* pelo parâmetro funcional, verificaram a ausência de isopleia, mas a análise morfológica mostrou o contrário.

A subtribo Cassiinae apresenta várias espécies enantiostílicas monomórficas nos gêneros *Cassia* L. (Dulberger 1981; Westerkamp 2004), *Chamaecrista* Moench. (Fenster 1995; Costa *et al.* 2007; Dutra *et al.* 2009; Almeida *et al.* 2013a; Almeida *et al.* 2013b) e *Senna* Mill. (Carvalho & Oliveira 2003; Ribeiro & Lovato 2004; Laporta 2005), constituindo um interessante modelo para a investigação da dinâmica de produção de morfos florais em espécies que possuem este mecanismo reprodutivo. Este estudo tem como objetivo avaliar a dinâmica na produção de morfos florais em populações de sete espécies e uma variedade enantiostílicas da subtribo Cassiinae. Nossa hipótese é de que as populações são isopléticas, mas podem adotar diferentes dinâmicas na produção de morfos florais.

Material e métodos

Área de estudo

O estudo foi desenvolvido de janeiro de 2012 a março de 2013 em uma área de 350 ha de caatinga no município de Petrolina, PE, nordeste do Brasil (09°19'36"S 40°32'51.2"W). A caatinga é um ecossistema exclusivamente brasileiro classificado como savana estépica arborizada (Teixeira 2001). O clima da região é tropical semiárido, Bswh' segundo Köppen (Nascimento *et al.* 2003), com temperatura e precipitação médias anuais de 26,3°C e 431 mm, respectivamente. A estação seca ocorre de maio a outubro e a chuvosa de novembro a abril (CPRM 2005).

Espécies estudadas

Foram estudadas sete espécies e uma variedade enantiofilicas monomórficas de Cassiinae: *Chamaecrista amiciella* (H.S.Irwin & Barneby) H.S.Irwin & Barneby (30 indivíduos; herbácea), *C. calycioides* (DC. ex Collad.) Greene (três agrupamentos; herbácea), *C. repens* (Vogel) H.S.Irwin & Barneby (15 indivíduos; herbácea); *C. serpens* (L.) Greene, (três agrupamentos; herbácea), *Senna macranthera* (DC. ex Collad.) H.S.Irwin & Barneby (20 indivíduos; arbórea), *S. macranthera* var. *pubibunda* (Benth.) H.S.Irwin & Barneby (10 indivíduos; arbórea), *S. martiana* (Benth.) H.S.Irwin & Barneby (15 indivíduos; arbórea) e *S. spectabilis* (DC.) H.S.Irwin & Barneby (10 indivíduos; arbórea). *Chamaecrista calycioides* e *C. serpens* tiveram suas flores contabilizadas por agrupamento porque não era possível identificar os indivíduos, em virtude do adensamento dos mesmos. O número de indivíduos ou agrupamentos floridos na área e na época de estudo determinou o tamanho amostral para cada espécie.

Todas as espécies e a variedade estudadas possuem flores amarelas, zigomorfas, com antese diurna de duração máxima de 12h, apresentam apenas pólen como recurso e são polinizadas por abelhas capazes de vibrar seus estames para a retirada do pólen (observação pessoal).

Amostras das espécies *Chamaecrista amiciella*, *C. calycioides*, *C. repens*, *C. serpens*, *Senna macranthera*, *S. macranthera* var. *pubibunda*, *S. martiana* e *S. spectabilis* foram depositadas no Herbário Vale do São Francisco (HVASF), sob os respectivos números de tombo, 19.764, 20.285, 15.245, 13.228, 20.992, 20.966, 16.837 e 16.811.

Produção de morfos florais

O número de flores direitas (D) e esquerdas (E) abertas diariamente foi determinado em campo durante sete dias consecutivos para todos os indivíduos/agrupamentos de todas as espécies. Nesta ocasião foram contabilizadas todas as flores abertas dos indivíduos. Devido ao fato das espécies terem antese muito curta e haver, portanto, uma substituição rápida de flores, consideramos o período de sete dias suficiente para amostrar satisfatoriamente a dinâmica da produção dos morfos florais. A proporção de flores D e E foi comparada no nível populacional, considerando-se tanto a produção diária quanto a produção total (acumulada) dos sete dias.

De acordo com o número de flores D e E, os indivíduos de *C. amiciella*, *C. repens*, *S. martiana*, *S. macranthera*, *S. macranthera* var. *pubibunda* e *S. spectabilis* foram classificados diariamente em (1) funcionalmente direitos (FD) quando apresentavam apenas flores D, ou quando o número de flores D era mais que o dobro do número de flores E do indivíduo; (2) funcionalmente esquerdos (FE) quando obedeciam ao critério anterior, mas levando-se em consideração o morfo esquerdo; (3) recíprocos (REC) quando não se enquadravam nas condições supracitadas. Os indivíduos que não produziram flores no dia analisado não foram enquadrados em nenhuma das categorias. Os números de indivíduos incluídos nas três categorias foram comparados entre si, considerando-se tanto a produção diária quanto a produção total dos sete dias.

Ao final dos sete dias, os indivíduos dessas espécies foram também enquadrados em categorias de repetição de 1 a 6, representando o número de dias consecutivos em que permaneceram em uma mesma categoria funcional. As espécies *C. calycioides* e *C. serpens* não foram incluídas nesta análise de classificação dos indivíduos, porque não foi possível identificar indivíduos nos agrupamentos.

Para comparar a proporção de flores D e E no nível populacional foram utilizados os testes de qui-quadrado ou G (quando o número de amostras não foi suportado pelo qui-quadrado; Zar 1996). A comparação do número de indivíduos incluídos nas categorias funcionais foi realizada usando-se uma ANOVA (Zar 1996). Todas as análises foram realizadas no programa BioEstat 5.0 (Ayres *et al.* 2007).

Resultados

O número médio de flores produzidas diariamente e no total por indivíduo ao final dos sete dias, e o total de flores das espécies estão expressos na Tabela 1. *Senna macranthera* var. *pubibunda* e *Chamaecrista amiciella* apresentaram a menor média diária de produção por indivíduo (1,3), tendo a primeira a menor média total (9,5). Já *S. spectabilis* apresentou a maior média (42 flores diárias e 293 no total).

Todas as espécies produziram número semelhante de flores D e E na população, considerando-se a produção diária e a produção acumulada (Figura 1A-H). Apenas a variedade *Senna macranthera* var. *pubibunda* não se apresentou isoplética nos quinto e sexto dias de observação (Figura 1E).

Todas as espécies tiveram indivíduos classificados como FD, FE e REC quando a produção diária e a produção total foram consideradas (Figura 2A-E), com exceção de

Senna spectabilis, que não teve indivíduos FE (Figura 2F). Houve variação entre espécies em relação à proporção de indivíduos nas categorias funcionais exibidas diariamente. Duas espécies apresentaram proporção semelhante no número de indivíduos das três categorias em todos os dias (*Chamaecrista amiciella* e *S. macranthera* var. *pubibunda*; Figura 2A e D), duas apresentaram razão equilibrada das categorias FD e FE na maioria dos dias (*C. repens* e *S. martiana*; Figura 2B e E) e uma (*S. macranthera*) apresentou proporções semelhantes dessas categorias em apenas dois dias de observação (Figura 2C).

Todas as espécies, com exceção de *C. amiciella* e *S. macranthera* var. *pubibunda*, tiveram a categoria REC como a mais representativa em número de indivíduos em todos os dias de análise (Figura 2A-F). Esta categoria também foi a mais bem representada quando se considerou o total acumulado em todas as espécies, sendo a única categoria presente em *C. repens*, *S. macranthera*, *S. martiana* e *S. spectabilis* (Figura 2A-F).

A maior parte das espécies apresentou variação na repetição de categorias funcionais ao longo do período de análise (Figura 3A-F). *Chamaecrista amiciella* e *S. macranthera* var. *pubibunda* não apresentaram indivíduos apenas nas categorias seis e cinco, respectivamente (Figura 3A-D); *C. repens* e *S. martiana* não apresentaram indivíduos nas categorias quatro e cinco (Figura 3B-E), *S. macranthera* não teve representantes nas categorias três e quatro (Figura 3C) e *S. spectabilis* não teve representantes nas categorias três, quatro e cinco, além de não apresentar indivíduos enquadrados em uma categoria apenas por um dia (Figura 3F).

Alguns indivíduos de *C. amiciella*, *C. repens*, *S. macranthera* e *S. macranthera* var. *pubibunda* produziram flores de apenas um morfo em ao menos um dia. *Chamaecrista amiciella* foi a espécie que apresentou maior número desses eventos, 122 (29% do total), sendo 57 E e 65 D; *S. macranthera* var. *pubibunda* apresentou 74 eventos (26,4% do total), sendo 36 E e 38 D, *C. repens* apresentou 7 (3,3%), sendo 5 E e 2 D e *S. macranthera* apresentou 5 (1,9%), sendo 1 E e 4 D. Estes eventos ocorreram em proporção equilibrada de morfos D e E em *C. amiciella* e *S. macranthera* var. *pubibunda* quando se considerou a proporção diária destes indivíduos.

Discussão

A isopletia encontrada para as espécies estudadas é uma tendência observada em trabalhos relacionados a espécies enantioestéricas monomórficas (Jesson & Barrett 2003;

Tang & Huang 2005; Almeida *et al.* 2013a, b) e dimórficas (Ornduff 1974), espécies heterostílicas (Riveros *et al.* 1995; Ree 1997; Paillet e Thompson 1997; Teixeira & Machado 2004; Pereira & Barbosa 2006; Lenza *et al.* 2008) e inversostílicas (Pauw 2005). Na enantioestilia, flores direitas captam pólen do lado direito e depositam pólen no lado esquerdo dos polinizadores, e em flores esquerdas ocorre o inverso (Bahadur *et al.* 1990). Portanto, a proporção equilibrada de flores D e E é necessária para que ambos os grupos tenham chances semelhantes de receber pólen do morfo oposto (Gottsberger & Silberbauer-Gottsberger 1988; Bahadur *et al.* 1990; Barrett 1992; Kohn *et al.* 1996; Barrett 2002), já que a funcionalidade do mecanismo reprodutivo está baseada na deposição e captura de pólen dos morfos florais em locais específicos dos polinizadores.

A produção diária em maior número de um dos morfos em alguns indivíduos, fazendo com que sejam funcionalmente D ou E, pode representar a ocorrência de um novo mecanismo reprodutivo de espécies enantioestílicas monomórficas, já que alguns estudos apenas registraram a produção exclusiva de flores D ou E em dias alternados por indivíduos dessas espécies como estratégia reprodutiva (Barrett *et al.* 2000; Tang & Huang 2005; Almeida *et al.* 2013b). Este mecanismo faz com que os indivíduos sejam funcionalmente dimórficos e, portanto, reduzam as chances de geitonogamia. No entanto, até onde sabemos, não foi relatada que a produção predominante de flores D ou E por indivíduos de espécies enantioestílicas monomórficas pode apresentar-se semelhante na diminuição da geitonogamia, apesar de ser menos eficiente do que a estratégia de dimorfismo funcional acima relatada.

A proporção semelhante de indivíduos em cada categoria funcional quando se considerou a produção diária de quatro espécies e uma variedade (*C. amiciella* e *S. macranthera* var. *pudibunda* nas categorias FD, FE e REC, e *C. repens*, *S. macranthera* e *S. martiana* nas categorias FD e FE) indica a existência de isoplethia de categorias funcionais, o que minimiza as chances de geitonogamia (Barrett 2002; Tang & Huang 2005). Tal equilíbrio foi também observado quando se considerou a produção total de flores, já que a categoria REC ocorreu com maior frequência.

Os resultados acima descritos mostram que os indivíduos possuem uma alternância de categorias de funcionalidade ao longo dos dias, levando a um equilíbrio no número de morfos produzidos ao final dos sete dias. A maior quantidade de indivíduos nas categorias de repetição mais baixas (1-3) reforça essa afirmação, mostrando a curta permanência em uma mesma categoria e, portanto, variando em

relação ao morfo predominantemente produzido diariamente (quando se considera um período de sete dias). A seleção de indivíduos que apresentam maior variação nas categorias de funcionalidade é mais um fator que evidencia a importância dos cruzamentos entre indivíduos de espécies hercogâmicas recíprocas.

A ocorrência da categoria FD para a espécie *S. spectabilis* apresentou-se restrita a um único indivíduo, que pode estar utilizando uma estratégia diferenciada em relação a outros indivíduos na sua população. Neste sentido, pode-se admitir a possibilidade de variação das estratégias em indivíduos da mesma espécie, sendo selecionados diferentemente. Sendo possível que, em outras populações, a categoria FD ocorra juntamente com as categorias FE e REC.

O período de sete dias foi satisfatório para a amostragem do número de flores D e E, e de indivíduos nas categorias funcionais, pois nenhum indivíduo permaneceu em uma categoria por mais de seis dias. Com isso, a determinação da dinâmica na produção de flores e das estratégias utilizadas foi possível para todas as espécies.

A predominância de indivíduos REC é benéfico para a reprodução da espécie. No caso de haver redução ou perda de indivíduos FD e FE por eventos estocásticos ou anomalias ligadas a indivíduos de um dos morfos, os indivíduos REC tem alguma garantia de produção de frutos e sementes, já que contem os dois morfos florais. De acordo com esta perspectiva, a existência de indivíduos REC é também vantajosa em relação a espécies enantiofilicas dimórficas e heterófilicas, que produzem apenas um morfo no indivíduo e dependem de indivíduos do morfo oposto para ter sucesso reprodutivo. Podemos considerar, portanto, que espécies enantiofilicas monomórficas possuem uma flexibilidade reprodutiva maior do que espécies enantiofilicas dimórficas e heterófilicas.

A produção de um número reduzido de flores diárias observada em três espécies e uma variedade estudadas é interpretada como outra estratégia que minimiza as chances de geitonogamia em espécies enantiofilicas monomórficas (Lloyd 1992; Harder & Barrett 1995; Barrett 2002; Tang & Huang 2005). Produzindo poucas flores por dia, essas espécies tenderiam a ser funcionalmente dimórficas, já que a possibilidade da produção de apenas um dos morfos forais seria elevada (Barrett *et al.* 2000). Esta tendência foi também observada nas espécies enantiofilicas monomórficas *C. flexuosa* (Almeida *et al.* 2013b), *Monochoria korsakowii* e *M. vaginalis* (Tang & Huang 2005). Essas espécies produziram no máximo três flores por indivíduo/dia, muitas vezes de

apenas um morfo, similarmente ao observado para alguns indivíduos de *C. amiciella*, *C. repens*, *S. macranthera* e *S. macranthera* var. *pudivunda*. É interessante notar que *C. amiciella* e *S. macranthera* var. *pudivunda* apresentaram também o maior número de categorias de repetição FD e FE. Isto indica que alguns indivíduos dessas espécies tendem a produzir um único morfo, assemelhando-se morfológica e funcionalmente a espécies dimórficas.

De forma preliminar, podemos sugerir como ocorreu uma possível transição da enantiostilia monomórfica para dimórfica tendo como modelo este estudo. Apesar de espécies enantiostílicas monomórficas e dimórficas serem geneticamente distintas (Jesson & Barrett 2002; Levin & Palmer 2007), a transição da condição monomórfica para a dimórfica é bastante possível. Isto porque espécies monomórficas tem a capacidade de produzir os dois morfos, e para que elas se tornem dimórficas seria necessário apenas que houvesse a fixação de um dos morfos pelos indivíduos (Barrett *et al.* 2000). Neste sentido, espécies monomórficas deram origem a dimórficas através da fixação de morfos distintos em diferentes indivíduos, pela pressão seletiva em busca da diminuição das taxas de geitonogamia e elevação da de xenogamia (Barrett *et al.* 2000).

Nossos resultados corroboram a idéia de que espécies hercogâmicas recíprocas tendem a apresentar a isoplelia como forma da maximização dos cruzamentos entre morfos. Além disso, os dados mostram que a variação temporal na produção dos morfos e o número reduzido de flores produzidas diariamente são estratégias apresentadas por espécies enantiostílicas monomórficas que podem maximizar as chances de polinização entre morfos e entre indivíduos, além de reduzir as chances de geitonogamia e de autopolinização, similarmente ao que ocorre com espécies enantiostílicas dimórficas e espécies heterostílicas. Contudo, as espécies enantiostílicas monomórficas não apresentam a fragilidade ecológica descrita para espécies de outros tipos de hercogamia recíproca, pois possuem a capacidade de expressão dos dois morfos florais no mesmo indivíduo.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Programa de Pós-graduação em Botânica da Universidade Federal Rural de Pernambuco pelo apoio financeiro e ao Centro de Referência para Recuperação de Áreas Degradadas (CRAD-UNIVASF) pelo apoio logístico.

Referências bibliográficas

- Almeida, N.M. Castro, C.C. Leite, A.V. Novo, R.R. and Machado, I.C. (2013)*a* Enantiostyly in *Chamaecrista ramosa* (Fabaceae-Caesalpinioideae): floral morphology, pollen transfer dynamics and breeding system. *Plant Biology*. **15**, 369-375.
- Almeida, N.M. Castro, C.C. Novo, R.R. Leite, A.V. and Machado, I.C. (2013)*b* Floral polymorphism in *Chamaecrista flexuosa* (Fabaceae-Caesalpinioideae): a possible case of atypical enantiostyly? *Annals of Botany* (Print). **112** (6), 1117-1123.
- Ayres, M. Ayres, Jr.M. Ayres, D.L. and Santos, A.S.S. (2007) *BioEstat: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas*. Belém, Sociedade civil Mamirauá.
- Bahadur, B. Chatuverdi, A. and Rama Swary, N. (1990) S.E.M. studies of pollen in relation to enantiostyly and heteranthery in *Cassia* (Caesalpinaceae). *Journal Palynology*. **1**, 7-22.
- Barrett, SCH. (1992) Heterostylous genetic polymorphisms: model systems for evolutionary analysis. In: S.C.H. Barrett (Ed). *Evolution and function of heterostyly*. Monographs on theoretical and applied genetics. Berlin, Springer-Verlag: 1-29.
- Barrett, SCH (2002) The evolution of plant sexual diversity. *Nature Reviews Genetics*. **3**, 274–284.

- Barrett, S.C.H. Wilken, D.H. and Cole, W.W. (2000) Heterostyly in the Lamiaceae: The case of *Salvia brandegeei*. *Plant Systematics and Evolution* (in press). **223**, 211-219.
- Bawa, K.S. (1974) Breeding systems of tree species of a lowland tropical community. *Evolution*. **28**, 85-92.
- Carvalho, D.A. and Oliveira, P.E. (2003) Biologia reprodutiva e polinização de *Senna sylvestris* (Vell.) H. S. Irwin and Barneby (Leguminosae, Caesalpinioideae). *Revista Brasileira de Botânica*. **26**, 319–328.
- CPRM - Companhia de Pesquisa de Recursos Minerais (2005) *Projeto cadastro de fontes de abastecimento por água subterrânea. Diagnóstico do município de Petrolina, estado de Pernambuco*. J.C. Mascarenhas, A.B. Breno, L.C. Souza-Júnior, M.J.T.G. Galvão, S.N. Pereira & J.L.F. (Orgs). Recife, CPRM/PRODEEM.
- Costa, C.B.N. Lambert, S.M. Borba, E.L. Queiroz, L.P. (2007) Postzygotic reproductive isolation between sympatric taxa in the *Chamaecrista desvauxii* complex (Leguminosae-Caesalpinioideae). *Annals of Botany*. **99**, 625–635.
- Dulberger, R. (1981) The floral biology of *Cassia didymobotrya* and *C. auriculata* (Caesalpinaceae). *American Journal of Botany*. **68**, 1350–1360.
- Dutra, V.F. Vieira, M.F. Garcia, F.C.P. Lima, H.C. (2009) Fenologia reprodutiva, síndromes de polinização e dispersão em espécies de Leguminosae dos campos rupestres do Parque Estadual do Itacolomi, Minas Gerais, Brasil. *Rodriguesia*. **60**, 371–387.
- Fenster, C.B. (1995) Mirror image and their effect on outcrossing rate in *Chamaecrista fasciculata* (Leguminosae). *American Journal of Botany*. **82**, 46–50.

- Gottsberger, G. and Silberbauer-Gottsberger, I. (1988) Evolution of flower structures and pollination in Neotropical Cassiinae (Caesalpiniaceae) species. *Phyton*. **28**, 293-320.
- Hamilton, C.W. (1990) Variations on a distylous theme in Mesoamerican *Psychotria* subgenus *Psychotria* (Rubiaceae). *Memoirs of the New York Botanical Garden*. **55**, 65-75.
- Harder, L.D. and Barrett, S.C.H. (1995) Mating cost of large floral displays in hermaphrodite plants. *Nature*. **373**, 512-515.
- Jesson, L.K. and Barrett, S.C.H. (2002) Solving the puzzle of mirror-image flowers. *Nature*. **417**, 707.
- Jesson, L.K. and Barrett S.C.H. (2003) The comparative biology of mirror-image flowers. *International Journal Plant Science*. **164 (5)**, 237-249.
- Kohn, J.R. Graham, S.W. Morton, B. Doyle, J.J. and Barrett t, S.C.H. (1996) Reconstruction of the evolution of reproductive characters in Pontederiaceae using phylogenetic evidence from chloroplast DNA restriction-site variation. *Evolution*. **50**, 1454-1469.
- Laporta, C. (2005) Floral biology and reproductive system of enantiostylous *Senna corymbosa* (Caesalpiniaceae). *Revista de Biologia Tropical*. **53**, 49-61.
- Lenza, E. Ferreira, J.N. Consolaro, H. and Aquino, F.G. (2008). Biologia reprodutiva de *Rourea induta* Planch. (Connaraceae), uma espécie heterostílica de cerrado do Brasil Central. *Revista Brasileira de Botânica*. **31 (3)**, 389-398.
- Levin, M. and Palmer A.R. (2007) Left–right patterning from the inside out: widespread evidence for intracellular control. *Bio Essays*. **29 (3)**, 271-287.

- Li, Q.J. Xu, Z.F. Xia, Y.M. Zhang, L. Deng, X.B. Gao, J.Y. (2001) Study of the flexistylous pollination mechanism in *Alpinia* plants (Zingiberaceae). *Acta Botanica Sinica*. **43**, 364–369.
- Lloyd, D.G. (1992) Self- and cross-fertilization in plants. The selection of self-fertilization. *International Journal of Plant sciences*. **153**, 370-380.
- Nascimento, C.E.S. Rodal, M.J.N. and Cavalcanti, A.C. (2003) Phytosociology of the remaining xerophytic woodland associated to an environmental gradient at the banks of the São Francisco river - Petrolina, Pernambuco, Brazil. *Revista Brasileira de Botânica*. **26**, 271-287.
- Ornduff, R. (1974) Heterostyly in South African flowering plants: A conspectus. *Journal of South African Botany*. **40**, 169-187.
- Pailler, T. and Thompson, J.D. (1997) Distyly and variation in heteromorphic incompatibility in *Gaertnera vaginata* (Rubiaceae) endemic to La Réunion Island. *American Journal of Botany*. **84** (3), 315-327.
- Pauw, A. (2005) Inversostyly: a new stylar polymorphism in an oil-secreting plant, *Hemimeris racemosa* (Scrophulariaceae). *American Journal of Botany*. **92** (11), 1878–1886.
- Pereira, M.S. and Barbosa, M.R.V. (2006) A família Rubiaceae na reserva biológica Guaribas, Paraíba, Brasil. Subfamílias Antirheoideae, Cinchonoideae e Ixoroideae. *Acta Botanica Brasilica*. **18** (2), 305-318.
- Ree, R.H. (1997) Pollen flow, fecundity, and the adaptive significance of heterostyly in *Palicourea padifolia* (Rubiaceae). *Biotropica*. **29** (3), 298-308.
- Ribeiro, R.A. Lovato, M.B. (2004) Mating system in a neotropical tree species *Senna multijuga* (Fabaceae). *Genetic Molecular Biology*. **27**, 418–424.

- Richards, J. H. and Koptur, S. (1993) Floral variation and distyly in *Guettarda scabra* (Rubiaceae). *American Journal of Botany*. **80** (1), 31-40.
- Riveros, G.M. Barría, O.R. and Humanã, P.A.M. (1995) Self-compatibility in distylous *Hedyotis salzmännii* (Rubiaceae). *Plant Systematics and Evolution*. **194**, 1-8.
- Sobrevila, C. Ramirez, N. and Enrech, N.X. (1983) Reproductive biology of *Palicourea fendleri* and *P. petiolares* (Rubiaceae), heterostylous shrubs of a tropical cloud forest in Venezuela. *Biotropica*. **15** (3), 161-169.
- Tang, L.L. and Huang, S.Q. (2005) Variation in daily floral display and the potential for geitonogamous pollination in two monomorphic enantiostylous *Monochoria* species. *Plant Systematics and Evolution*. **253**, 201–207.
- Teixeira, A.H.C. (2001) *Informações agrometeorológicas do Pólo Petrolina-PE/Juazeiro-BA*. Petrolina: Embrapa Semiárido.
- Teixeira, L.A.G. and Machado, I.C. (2004) *Sabicea cinerea* Aubl. (Rubiaceae): distília e polinização em um fragmento de floresta Atlântica em Pernambuco, Nordeste do Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*. **27**, 193-204.
- Westerkamp, C. (2004) Ricochet pollination in cassias – and how bees explain enantiostyly. In: Freitas, B.M. Pereira J.O.P. (Eds), *Solitary bees: conservation, rearing and management for pollination*. Imprensa Universitária, Fortaleza, Brazil, 225–230.
- Zar, J.H. (1996) *Bioestatistical analysis*. Prentice-Hall, New Jersey.

Tabela 1. Média de flores (dp) produzidas por indivíduo e populações diariamente e total, após sete dias consecutivos em espécies enantiostrólicas monomórficas em uma área de caatinga no nordeste do Brasil. CA=*Chamecrista amiciella*; CC= *C. calycioides*; CR=*C. repens*; CS=*C. serpens*; SM=*S. macranthera*; SMP=*S. macranthera* var. *pudibunda*; SMT=*S. martiana*; SS=*S. spectabilis*. Ind./dia: média da produção diária por indivíduo; Ind./total: média da produção total por indivíduo; Pop./dia média de flores produzidas por dia pela população; Pop. total: produção total da população.

	CA	CC	CS	CR	SMC	SMP	SMT	SSP
Ind./dia	1,3 ($\pm 0,2$)	-	-	9 ($\pm 2,5$)	3,7 ($\pm 0,67$)	1,3 ($\pm 0,25$)	9,1 ($\pm 2,5$)	42 ($\pm 3,1$)
Ind./total	9,7 ($\pm 3,3$)	-	-	64 (± 25)	26,4 ($\pm 7,2$)	9,5 ($\pm 2,7$)	64 (± 25)	293 (± 144)
Pop./dia	42 (± 6)	358 (± 95)	900 (± 87)	137 (± 37)	38 ($\pm 6,7$)	26,5 (± 6)	138 (± 38)	420 (± 31)
Pop./total	293	2506	6296	960	264	189	966	2935

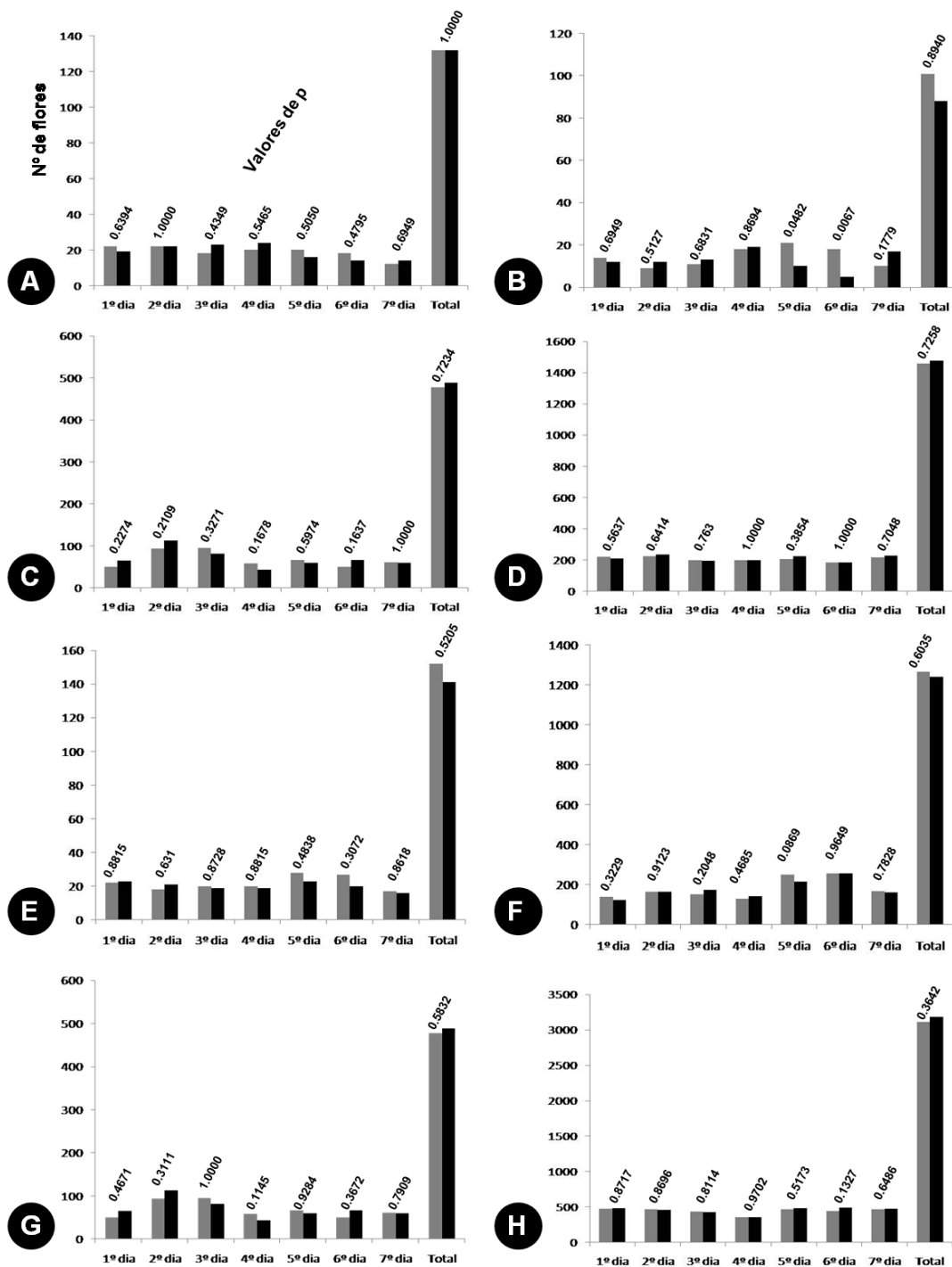


Figura 1. Número de flores direitas (D) e esquerdas (E) produzidas na população diariamente e o total durante sete dias consecutivos por espécies enantiostílicas monomórficas em uma área de caatinga no nordeste do Brasil. A) *Chamecrista amiciella*; B) *C. calycioides*; C) *C. repens*; D) *C. serpens*; E) *Senna macranthera* var. *pubibunda*; F) *S. macranthera*; G) *S. martiana*; H) *S. spectabilis*. Teste qui quadrado com valores não significativos $p=0,05$.

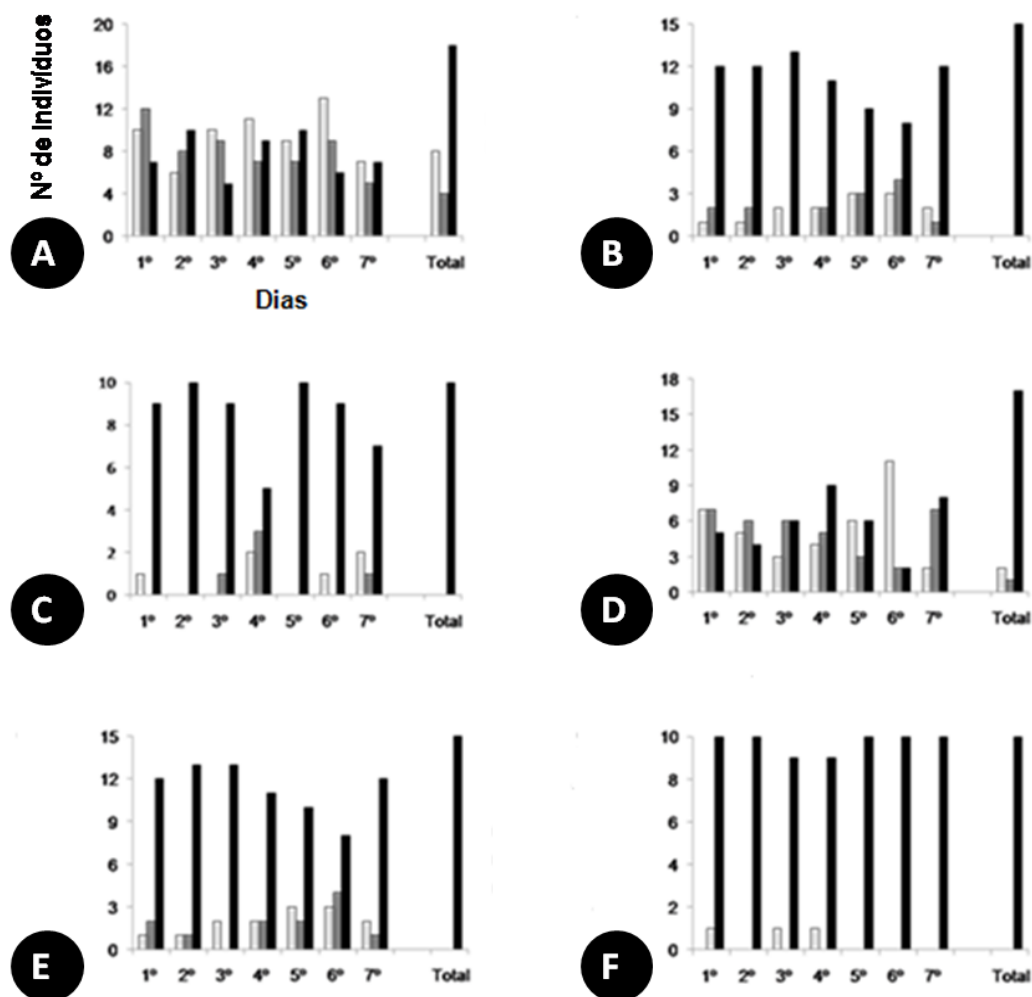


Figura 2. Número de indivíduos classificados como funcionalmente direitos (FD) □ , funcionalmente esquerdos (FE) ■ e recíprocos (REC) ■ , diariamente e o total (acumulado) após sete dias consecutivos, por espécies enantiostílicas monomórficas em uma área de caatinga no nordeste do Brasil. A) *Chamaecrista amiciella*; B) *C. repens*; C) *Senna macranthera*; D) *S. macranthera* var. *pubibunda*; E) *S. martiana*; F) *S. spectabilis*

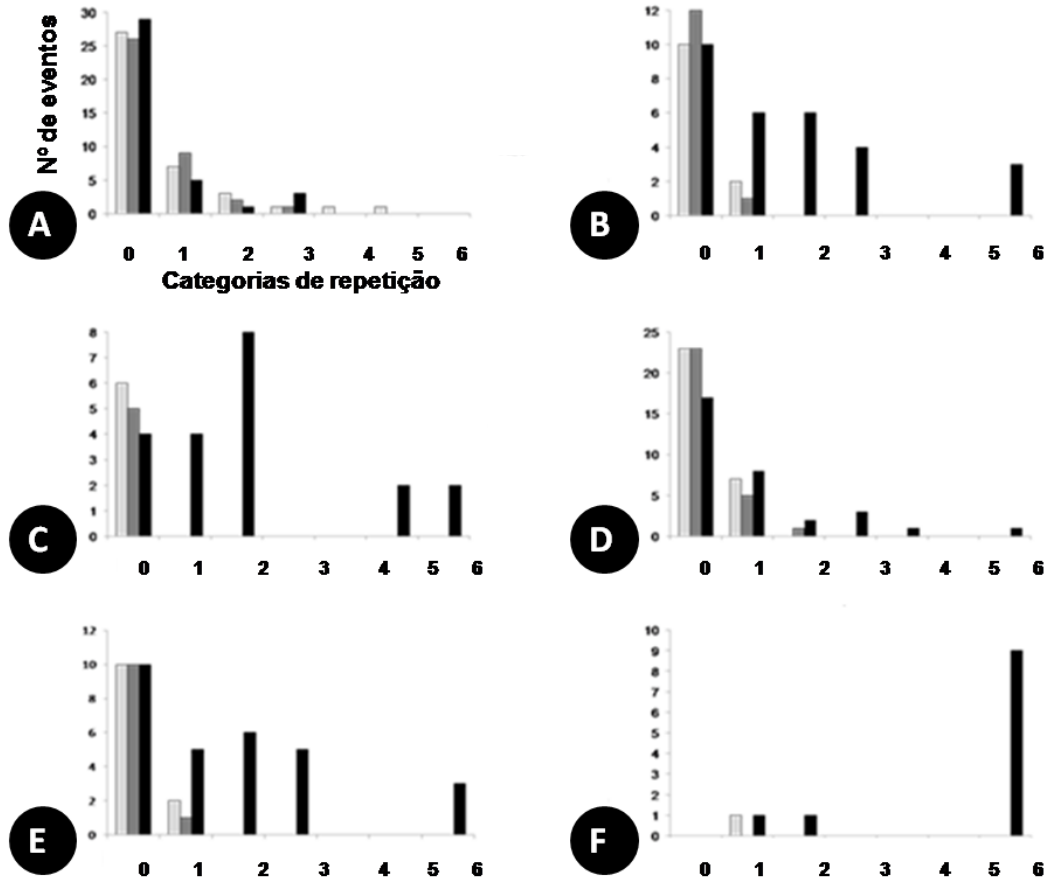


Figura 3. Número de eventos de repetição das categorias funcionais funcionalmente direitos (FD) □ , funcionalmente esquerdos (FE) ■ e recíprocos (REC) ■ , de espécies enantiostílicas monomórficas em uma área de caatinga no nordeste do Brasil. A) *Chamaecrista amiciella*; B) *C. repens*; C) *Senna macranthera*; D) *S. macranthera* var. *pudibunda*; E) *S. martiana*; F) *S. spectabilis*.

Capítulo 2

Mecanismos morfológicos e fisiológicos de incompatibilidade em espécies enantiostílicas da subtribo Cassiinae

Manuscrito a ser enviado ao periódico Oikos

**Mecanismos morfológicos e fisiológicos de incompatibilidade em espécies
enantiostílicas da subtribo Cassiinae**

Natan Messias de Almeida¹; José Alves de Siqueira Filho²; Paulo Eugênio de Oliveira³
e Cibele Cardoso de Castro⁴

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

²Universidade Federal do Vale do São Francisco, Rodovia BR 407, 12 Lote 543, Projeto
de Irrigação Nilo Coelho, s/n, C1, Petrolina, PE, Brasil, 56300-000.

³Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia, Av. Pará, 1720, Umuarama,
Uberlândia, MG, Brasil, 38405-382.

⁴Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Avenida Bom Pastor, s/n, Boa Vista, Garanhuns, PE, Brasil, 55292-270.

Título resumido: Mecanismos morfológicos e fisiológicos de incompatibilidade de
espécies enantiostílicas

Autor para correspondência: cibelegastro@hotmail.com

Resumo

Os cruzamentos entre morfos florais de espécies enantiostílicas são viabilizados pela deposição e captação de pólen dos morfos direito e esquerdo em locais opostos do corpo dos polinizadores. Esta funcionalidade da enantiostilia é considerada um mecanismo morfológico de incompatibilidade e constitui um importante fator promotor da polinização cruzada, já que a maior parte das espécies enantiostílicas em Cassiinae apresentam mecanismos fisiológicos de auto-incompatibilidade e nenhuma apresenta incompatibilidade intra-morfo. Apesar de existir este padrão morfofisiológico para a enantiostilia, sabe-se que as espécies podem variar em relação a essas características. Este trabalho teve como objetivo investigar os mecanismos morfológicos e fisiológicos de incompatibilidade que atuam na autopolinização e nos cruzamentos intra e intermorfo de espécies enantiostílicas monomórficas. Foram escolhidas como modelo sete espécies da subtribo Cassiinae (três do gênero *Senna* Mill e quatro do gênero *Chamaecrista* Moench) ocorrentes em uma área de caatinga e uma de restinga no nordeste do Brasil. Foram investigados o comportamento dos visitantes florais, o padrão de deposição (pelas anteras) e captação (pelo estigma) de pólen no corpo dos polinizadores e o sistema reprodutivo. Todos os visitantes agarraram-se às anteras e exerceram movimentos vibratórios para a retirada do pólen. Todas as espécies, exceto *Senna martiana* e *Chamaecrista repens*, apresentaram o padrão de deposição e captação de pólen descrita para espécies enantiostílicas. As espécies são autocompatíveis, exceto *Senna macranthera* var. *pudivunda* e *S. martiana*; esta última aparentemente encontra-se sob depressão por endogamia. A compatibilidade intramorfo ocorreu para todas as espécies. A ausência de mecanismos fisiológicos de incompatibilidade mostra a importância da interação entre a morfologia floral e os polinizadores para a funcionalidade da enantiostilia e o sucesso reprodutivo em espécies enantiostílicas monomórficas.

Palavras chave: Cruzamentos intra e intermorfo, enantiostilia, fluxo polínico, mecanismos de incompatibilidade.

Introdução

O sucesso reprodutivo de espécies enantiofíticas depende da ocorrência de cruzamentos entre os morfos florais (intermorfo; Barrett 2002). É a morfologia floral que faz com que a deposição (pelas anteras) e a captação (pelo estigma) de pólen dos morfos florais esquerdo (E) e direito (D) ocorram em locais opostos do corpo do polinizador. Por esta razão a transferência de pólen ocorre apenas entre os morfos florais recíprocos (Delgado e Souza 1997; Gottsberger e Silberbauer-Gottsberger 1988; Westerkamp 2004). Este padrão tem sido registrado em espécies enantiofíticas da subtribo Cassiinae (Westerkamp 2004; Laporta 2005; Almeida et al. 2013a) e também em espécies que possuem outros tipos de hercogamia recíproca, tais como a heterostilia, a flexistilia e a inversostilia (Jesson e Barrett 2002; Pauw 2005)

Mecanismos de incompatibilidade são pouco comuns em espécies enantiofíticas (Barrett 2002), mas já foram relatados para espécies de *Senna* Mill. e *Cassia* L. (Bahadur et al. 1979; Carvalho e Oliveira 2003; Torres 2009; Leite e Machado 2010). A autoincompatibilidade é registrada na subfamília Caesalpinioideae, grupo no qual as Cassiinae (*Cassia*, *Senna* e *Chamaecrista*) estão inseridas, especialmente em espécies arbóreas que possuem estigma úmido (Arroyo 1981; Owens e Lewis 1989). Contudo, esta incompatibilidade parece não ter ligação com a ocorrência da enantiofília, já que nestes estudos os cruzamentos foram realizados sem distinção entre morfos florais (Bahadur et al. 1979; Carvalho e Oliveira 2003; Leite e Machado, 2010).

Não há registros de impedimentos fisiológicos dos cruzamentos intramorfo em espécies enantiofíticas (Almeida et al. 2013a;b). Da mesma forma, não existem registros de favorecimento de cruzamentos intermorfos, inversamente ao que é descrito para a heterostilia, em que este tipo de incompatibilidade é considerado padrão (Ganders 1979; Web e Lloyd 1986; Barrett 2002; 2003). Sendo assim, mecanismos morfológicos de incompatibilidade em espécies enantiofíticas se tornam essenciais para a ocorrência de cruzamentos legítimos (entre morfos recíprocos), elevando as taxas de xenogamia e reduzindo as de geitonogamia (Barrett 2002; Almeida 2013a).

Este trabalho teve como objetivo investigar os mecanismos morfológicos e fisiológicos de incompatibilidade de espécies enantiofíticas monomórficas, tendo como modelo espécies da subtribo Cassiinae. Nossas hipóteses são: 1) As espécies enantiofíticas da subtribo Cassiinae apresentam padrões de deposição e captação de pólen já descritos para outras espécies enantiofíticas, pela dependência da ocorrência

do intercruzamento; 2) Mecanismos fisiológicos de auto-incompatibilidade e incompatibilidade intramorfo são inexistentes nessas espécies, sendo o padrão de cruzamentos (intermorfo) determinado pela funcionalidade de mecanismos morfológicos florais.

Material e métodos

Áreas de estudo

O estudo foi desenvolvido em duas áreas do nordeste do Brasil, em períodos diferentes: entre maio e julho de 2011 e entre outubro de 2011 a abril de 2013. No primeiro período os dados foram coletados em uma área de vegetação de restinga na Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) Nossa Senhora do Oiteiro de Maracaípe, município de Ipojuca, PE, nordeste do Brasil (08°31'48'' S e 35°01'05'' W). A RPPN ocupa uma área de 76,2 ha, sendo 60,96 ha cobertos por vegetação de restinga (Almeida Jr. et al. 2009). O clima é quente e úmido (As' Köppen 1948). A precipitação pluviométrica média anual é de aproximadamente 2000 mm, com maior concentração de maio a julho; o período mais seco é de outubro a dezembro (SUDENE 1990; INMET 2005).

No segundo período o estudo foi desenvolvido em uma área de 350 ha de caatinga no município de Petrolina, PE, nordeste do Brasil (09°19'36''S 40°32'51.2''W). A Caatinga é um ecossistema exclusivamente brasileiro classificado como savana estépica arborizada (Teixeira 2001). O clima da região é tropical semiárido, Bswb' segundo Köppen (Nascimento *et al.* 2003), com temperatura e precipitação médias anuais de 26,3°C e 431 mm, respectivamente. A estação seca ocorre de maio a outubro e as chuvas se distribuem entre os meses de novembro a abril (CPRM 2005).

Espécies estudadas

Foram estudadas sete espécies enantiofilicas monomórficas da subtribo Cassiinae, sendo quatro do gênero *Chamaecrista* Moench. (Herbáceas) [*Chamaecrista amiciella* (H.S.Irwin e Barneby) H.S.Irwin e Barneby; *C. calycioides* (DC. ex Collad.) Greene; *C. repens* (Vogel) H.S.Irwin e Barneby); *C. rotundifolia* (Pers.) Greene] e três do gênero *Senna* Mill. (Arbóreas) [*Senna macranthera* (DC. ex Collad.) H.S.Irwin e Barneby; *S. macranthera* var. *pubibunda* (Benth.) H.S.Irwin e Barneby; *S. martiana* (Benth.) H.S.Irwin and Barneby]. Todas possuem anteras poricidas que necessitam de

vibração para liberação do pólen. Apresentam antese diurna, variando de 6 a 12h de duração, com estigmas e anteras funcionais no início da antese, podendo permanecer abertas no dia seguinte, provavelmente exercendo função atrativa. *Chamaecrista rotundifolia* foi estudada na área de restinga, e as demais na área de caatinga.

Visitantes florais

O comportamento dos visitantes florais foi determinado por meio de observações focais (12-20h de observação), quando foram classificados em polinizadores (ao entrar em contato com as estruturas reprodutivas) ou pilhadores (quando não contataram ou contataram apenas uma das estruturas), bem como a estratégia de coleta do pólen (vibradoras, mordedoras ou coletoras, *sensu* Wille 1963). Os visitantes foram coletados e enviados a especialistas para identificação.

Dinâmica da transferência de grãos de pólen

Para avaliar os locais de deposição de pólen nos visitantes florais, estes foram capturados com potes de vidro de "boca" larga com algodão embebido em acetato de etila e observados sob estereomicroscópio logo após os eventos de interação em ambos os morfos, nas primeiras horas da manhã. Para averiguar o local de contato do estigma com o corpo das abelhas, foi colocada graxa na superfície estigmática. Da mesma forma os visitantes foram coletados imediatamente após as polinizações e observados para registro dos locais de deposição da substância (adaptado de Almeida 2013a).

Sistema reprodutivo

Para investigar o sistema reprodutivo, foram realizadas a) autopolinização manual (flores direitas-D e esquerdas-E receberam pólen das suas próprias anteras) b) autopolinização espontânea (botões D e E em pré-antese foram ensacados); c) polinização cruzada (cruzamentos intramorfos DxD e ExE e intermorfos DxE e ExD). As flores doadoras de pólen foram coletadas em agrupamentos distintos e distantes no mínimo 30 m das flores receptoras.

Para a espécie *Senna martiana* foram realizados outros dois experimentos nos tratamentos de autopolinização manual e polinização cruzada intra e intermorfo, previamente às polinizações manuais: a) baixa vibração (o estigma foi contactado com um diapasão de 400Hz de frequência; n=79) e b) alta vibração (o estigma foi contactado

com barbeador elétrico portátil de frequência maior que 2000Hz; Gómez et al 2010; n=88). A realização de tratamentos do sistema reprodutivo exercendo vibração anterior aos cruzamentos justifica-se pelo fato de que este procedimento pode favorecer a formação de frutos, por ativar a receptividade estigmática (Gómez et al. 2010).

Após os tratamentos de autopolinização manual e polinização cruzada, as flores foram ensacadas por todo período de antese. Para avaliação da formação de frutos por polinização natural, flores D e E foram deixadas expostas à ação dos visitantes florais. Foi registrada a formação de frutos após todos os tratamentos e o controle.

Para verificar semelhanças no número de frutos formados por ambos os morfos em todos os tratamentos, além de comparar os resultados da polinização natural com as polinizações cruzadas inter e intramorfo, foram utilizados os testes qui-quadrado e G quando não suportado pelo primeiro, através da ferramenta estatística Bioestat 5.0 (Ayres et al., 2007).

Foram realizadas polinizações manuais para o acompanhamento do crescimento de tubos polínicos após as polinizações cruzadas intra e intermorfo. Os pistilos polinizados foram mantidos em placas tipo gerbox contendo solução aquosa gelificada de ágar a 2% e fixados em FAA 70 em intervalos de 12 e 24 horas após a polinização manual (n=10 flores por intervalo/tratamento). A observação dos tubos polínicos foi realizada sob microscópio de fluorescência (adaptado de Martin, 1959).

Resultados

Visitantes florais

Todas as espécies foram visitadas apenas por abelhas. *Chamaecrista amiciella*, *C. calycioides* e *C. repens* receberam visitas de *Centris* sp1 e *Centris* sp2, e *Senna macranthera*, *S. macranthera* var. *pubibunda* e *S. martiana* de *Xylocopa* (Neoxylocopa) *cearensis*, *Xylocopa* (Neoxylocopa) *grisescens*, *Xylocopa* (Neoxylocopa) sp. e de *Centris* sp1. *Chamaecrista rotundifolia* recebeu visitas apenas de *Florilegus* (Eufleurilegus) sp.

Todas as abelhas apresentaram comportamento de visita semelhante em todas as espécies de planta, agarrando-se às anteras e exercendo movimentos vibratórios que resultavam na liberação dos grãos de pólen. Em *Chamaecrista repens*, *Centris* sp1 e *Centris* sp2 utilizaram a pétala diferenciada como plataforma de pouso antes de praticarem a vibração.

As visitas às flores de *Senna* ocorreram nas primeiras horas da manhã (por volta das 05:00h), e cessaram no fim da tarde (17:00h aproximadamente). As visitas às espécies de *Chamaecrista* iniciaram no mesmo horário, mas se estenderam apenas até o início da tarde (por volta das 14:00h), ocasião em que as flores já se encontravam senescentes.

Dinâmica da transferência de grãos de pólen

A deposição e a captação de pólen seguiram padrão semelhante em todas as espécies: os grãos de flores D e E foram depositados pelas anteras e capturados pelo estigma em lados opostos no corpo do polinizador (Figuras 1A-G). As únicas exceções foram *Chamaecrista repens* e *Senna martiana*, cujo posicionamento das anteras de ambos os morfos resultou na deposição do pólen concomitantemente nos lados direito e esquerdo do corpo (Figuras 1C e G).

Em *Chamaecrista rotundifolia* os grãos foram depositados na região ventral e dorsal do tórax dos visitantes (próximo à cabeça), e também na região ventral do abdômen (Figura 1D). Nesta espécie o direcionamento dos grãos é realizado por um arco formado pela pétala falcada e as três pétalas vizinhas a ela quando a flor é visitada, mudando sua conformação; portanto, a deposição de pólen é indireta, já que não é realizada pelas anteras. As anteras apresentam tamanhos distintos e diferença no direcionamento dos poros, sendo um grupo voltado para o centro da pétala falcada e outro para o lado oposto ao estilete. Os vestígios de graxa no corpo dos polinizadores foram encontrados em locais coincidentes aos da deposição do pólen (Figura 1D).

Chamaecrista calycioides apresentou uma arquitetura de pétalas curvadas que possibilita o direcionamento dos grãos de pólen das anteras de polinização para a região dorsal-torácica (deposição indireta), e as de alimentação liberam pólen na região ventral das abelhas (Figura 1B). Neste caso, não ocorre modificação da arquitetura floral durante as visitas. Suas anteras apresentam o mesmo padrão descrito para *C. rotundifolia*.

Chamaecrista repens também apresenta o conjunto de pétalas curvadas que direciona os grãos ao dorso dos visitantes, na junção do tórax com o abdômen, sendo a deposição realizada de forma indireta (Figura 1C). Há dois grupos de anteras, um de tamanho menor e centralizado (que deposita pólen no ventre das abelhas) e outro maior formado por três anteras, duas no lado oposto ao estilete e uma acompanhando a

deflexão do estilete (depositam pólen no dorso das abelhas). Vestígios de graxa foram encontrados nos mesmos locais da deposição do pólen, na região dorsal dos visitantes.

Em *C. amiciella* a pétala diferenciada ocorre em forma de tubo, exercendo a mesma função do conjunto de pétalas apresentado pelas outras espécies, e que deposita o pólen no dorso e no ventre dos visitantes (Figura 1A). A captação, verificada pelos vestígios de graxa encontrados no corpo dos visitantes, foi realizada em local oposto ao da deposição de pólen.

Senna macranthera e *S. macranthera* var. *pudibunda* apresentaram dois grupos de estames. O grupo localizado no centro da flor deposita pólen no ventre do visitante, e aquele localizado inversamente ao estilete deposita na porção dorsal do abdômen. Os estiletos de flores E deixaram vestígios de graxa no lado esquerdo dos visitantes, e os de flores D no lado direito (Figura 1E e F). Da mesma forma, *S. martiana* apresenta dois grupos de estames: no centro da flor, estames menores depositam pólen no ventre dos visitantes, enquanto em lados opostos, dois estames maiores depositam pólen de forma indireta no dorso do polinizador próximo a região da cabeça (Figura 1G). Como citado anteriormente, os estames maiores desta espécie depositam pólen nos dois lados do corpo do polinizador, podendo doar pólen para flores direitas e esquerdas sem impedimentos morfológicos. A captação do pólen obedeceu ao lado referente a cada morfo: flores esquerdas capturam pólen no lado esquerdo e flores direitas no lado direito do corpo do polinizador, coincidindo com o local de deposição (Figura 1G).

Sistema reprodutivo

As espécies *Chamaecrista amiciella*, *C. calycioides*, *C. repens*, *C. rotundifolia*, *Senna macranthera* e *S. martiana* formaram frutos em todos os tratamentos e na polinização natural, com exceção da autopolinização espontânea, na qual nenhuma das espécies estudadas apresentou formação de frutos (Tabela 1). O número de frutos formados de ambos os morfos nos tratamentos não diferiram significativamente, bem como quando comparado o número de frutos formados na polinização natural e cruzadas intra e intermorfo. A única exceção estas espécies foi *Chamaecrista calycioides* a qual apresentou diferenças significativas entre o número de frutos formados na polinização natural e cruzadas intra ($D \times Dd - Q=17.621$, $G1=1$, $p=<0.0001$; $E \times Ee - G=19.403$, $G1=1$, $p=<0.0001$) e intermorfo ($D \times Ed - Q=10.093$, $G1=1$, $p=0.0038$; $E \times De - G=10.647$, $G1=1$, $p=0.0033$).

Senna macranthera var. *pubibunda* não formou frutos na autopolinização manual. O número de frutos formados na polinização natural e na polinização cruzada intramorfo diferiu significativamente (D x Dd - $Q=17.621$, $Gl=1$, $p=<0.0001$; E x EE - $Q=19.403$, $Gl=1$, $p=<0.0001$), assim como quando comparado o número de frutos formados na polinização natural e da polinização cruzada intermorfo (D x Ed - $G=13.593$, $Gl=1$, $p=0.0008$; E x De - $G=5.610$, $Gl=1$, $p=0.0398$).

Flores esquerdas de *S. martiana* não formaram frutos após autopolinização manual. De maneira geral, o número de frutos formados foi baixo, grande parte abortados. O uso das duas frequências de vibração também resultou na formação de poucos frutos. Não houve diferença significativa no número de frutos formados entre os morfos D e E, nem nos experimentos de polinizações cruzadas intra e intermorfos para todas as espécies (Tabela 1).

Em todas as espécies foram observados tubos polínicos crescendo em profusão após as polinizações cruzadas intra e intermorfo. Após 12h da realização dos cruzamentos, um grande número de tubos já havia atingido o ovário e penetrado os óvulos em ambos os experimentos (Figura 2).

Discussão

As sete espécies estudadas corroboraram o padrão descrito para espécies da subtribo Cassiinae em relação ao tipo de polinização, as quais de maneira geral apresentam flores com anteras de deiscência poricida, dependendo exclusivamente de abelhas capazes de vibrar os estames para a liberação do pólen (Buchmann 1983; Gottsberger e Silberbauer - Gottsberger 1988). Assim como foi aqui registrado, estas abelhas apresentam grande porte, e em sua maioria pertencem aos gêneros *Xylocopa*, *Centris* e *Bombus* (Carvalho e Oliveira 2003; Westerkamp 2004; Laporta 2005; Del-Claro e Nascimento 2007; Almeida 2012; Almeida et al. 2013a,b).

O pequeno número de visitantes nas flores de todas as espécies já foi registrado em *Senna corymbosa*, que recebeu visitas, em um determinado período do ano, de apenas duas espécies de abelhas (Laporta 2005). Este baixo número pode ser explicado pelo alto nível de especialização necessário para que as abelhas retirem os grãos de pólen das anteras poricidas (Buchmann 1983; Frankie et al. 1983; Gottsberger e Silberbauer - Gottsberger 1988; Forni-Martins et al. 1998; Schlindwein 2000). Outros estudos mostram maior número de espécies de abelhas visitantes das flores de

representantes da subtribo Cassiinae (Carvalho e Oliveira 2003; Del-Claro e Nascimento 2007; Almeida 2012; Almeida et al. 2013a,b), contudo são abelhas não especializadas e que atuam como pilhadoras de pólen, o que não ocorreu no presente estudo.

As diferenças morfológicas das anteras (tamanho, coloração e/ou de posicionamento) ou de seus poros associadas à deposição de pólen em locais distintos do corpo do polinizador caracterizam a ocorrência de heteranteria (Vallejo-Marín et al. 2009; Almeida et al. 2013a). Na heteranteria os estames apresentam divisões nas funções de alimentação (cujo pólen é destinado à alimentação das larvas) ou de polinização (cujo pólen não pode ser removido pelas abelhas e é depositado, nesses animais, no mesmo local de contato com o estigma). Trata-se de uma característica bastante difundida nas espécies da subtribo Cassiinae (Vogel 1978; Buchmann 1983; Gottsberger e Silberbauer - Gottsberger 1988; Westerkamp 2004; Laporta 2005; Almeida 2012; Almeida et al. 2013a). Acredita-se que as funções diferentes de anteras em flores de pólen sejam um resultado de pressões seletivas favoráveis a uma limitação ao acesso ao pólen por pilhadores ou por polinizadores pouco eficientes. Como resultado, a coleta por abelhas especializadas é favorecida, uma vez que esses animais são muito eficientes na tarefa de retirada dos grãos (Vogel 1978; Carvalho e Oliveira 2003).

O padrão semelhante de deposição e captação de pólen observado em *Chamaecrista amiciella*, *C. calycioides*, *C. rotundifolia*, *Senna macranthera* e *S. macranthera* var. *pudivunda* corrobora com o esperado para espécies enantioestílicas: de maneira geral, ocorre deposição e captação do pólen em lados opostos do corpo dos visitantes por flores dos morfós recíprocos (Bahadur et al. 1990; Barrett 2002). Espécies enantioestílicas dos gêneros *Senna*, *Cassia* e *Chamaecrista* também seguem este padrão (Westerkamp 2004; Laporta 2005; Almeida 2012; Almeida et al. 2013a), o que parece viabilizar a enantioestilia por promover a diminuição das taxas de geitonogamia e elevação das de xenogamia (Bahadur et al. 1990; Barrett 1992; Kohn et al. 1996; Barrett 2002; Westerkamp 2004; Laporta 2005; Almeida et al. 2013a). A ocorrência deste padrão mostra a existência de mecanismos morfológicos de incompatibilidade intramorfo, já que a morfologia floral impede que esses cruzamentos ocorram.

Senna martiana e *Chamaecrista repens* fugiram do padrão enantioestílico, depositando pólen em ambos os lados do corpo do polinizador. Pela ausência de

mecanismos morfológicos de incompatibilidade, o cruzamento intramorfo e consequente elevação da geitonogamia passam a ocorrer naturalmente na população, podendo levar à depressão endogâmica e à limitação polínica nestas espécies (Lloyd 1992; Harder e Barrett 1995).

A deposição de pólen de forma indireta exercida por pétalas e aqui observada nas espécies do gênero *Chamaecrista* é bastante semelhante ao descrito para outras espécies do gênero e para espécies de *Cassia* (Westerkamp 2004; Costa et al. 2007; Dutra et al. 2009), sendo denominada de deposição por ricochete (Westerkamp 2004). No entanto, em *C. ramosa* o movimento dos grãos é semelhante a um “looping”, pois percorrem toda a extensão adaxial das pétalas antes de serem depositados no dorso dos polinizadores (Almeida et al. 2013a) diferindo do ricochete, no qual os grãos se chocam com pontos específicos das pétalas (Westerkamp 2004). Sendo assim, as espécies de *Chamaecrista* aqui estudadas apresentam pólen depositado por “looping” no dorso dos polinizadores. Em estudos com espécies do gênero *Senna* tem sido observado o contrário: a deposição de pólen feita de forma direta, o que foi verificado neste estudo para *S. macranthera* e *S. macranthera* var. *pudibunda*. (Carvalho e Oliveira 2003; Laporta 2005; Almeida 2012). *Senna martiana* aparece como exceção, já que apresenta deposição indireta de pólen. No momento da visita as anteras chegam a tocar nas pétalas, causando uma pequena depressão no local de contato, a qual direciona os grãos de pólen ao dorso dos visitantes.

Nossos resultados confirmam a hipótese de que os mecanismos de incompatibilidade na subfamília Caesalpinioideae (na qual de Cassiinae está inserida) foram perdidos por vários representantes herbáceos anuais, sendo mais comum a ocorrência em representantes de maior porte (Arroyo 1981). As espécies herbáceas do gênero *Chamaecrista* aqui estudadas são autocompatíveis, enquanto *Senna macranthera* var. *pudibunda* e *S. martiana*, representantes arbóreos, são autoincompatíveis. A autoincompatibilidade encontrada para estas espécies parece não estar relacionada à ocorrência da enantiostilia, e sim ao mecanismo de impedimento da autopolinização, tendo em vista que nos cruzamentos intra e inter morfo não houve diferenças no número de frutos formados e no crescimento dos tubos polínicos. Contudo, em *S. martiana* a enantiostilia atípica pode estar influenciando negativamente no seu sucesso reprodutivo, pela fuga no padrão de deposição de pólen comentado anteriormente.

Os mecanismos fisiológicos de incompatibilidade intramorfo ausente nas espécies estudadas, confirmados pela chegada de tubos polínicos aos óvulos e pela formação de frutos após polinização cruzada intramorfo, corrobora outros estudos de espécies enantiofíticas, que não registraram diferenças no número de frutos formados, não sendo avaliado, no entanto, o crescimento dos tubos polínicos após esses cruzamentos (Almeida et al. 2013a,b).

A formação reduzida atípica de frutos em *Senna martiana* já havia sido observada por Leite e Machado (2010). As autoras descreveram um sistema de incompatibilidade de ação tardia, dado que ganha força com o grande número de frutos abortados em todos os tratamentos aqui registrados. A maioria dos frutos abortados estava no início da formação, o que diferencia este sistema de incompatibilidade da depressão por endogamia (Seavey e Bawa 1986).

A ausência de mecanismos fisiológicos de incompatibilidade intramorfo relatada para espécies enantiofíticas foi comprovada com este estudo, diferindo do encontrado para espécies heterofíticas (Ganders 1979; Web e Lloyd 1986; Barrett 2002; Barrett 2003). Os mecanismos morfológicos de incompatibilidade descritos para essas espécies se tornam essenciais para a funcionalidade da enantiofília. Sendo assim, entende-se que espécies enantiofíticas da subtribo Cassiinae utilizam apenas da morfologia floral para garantir o sucesso reprodutivo, elevando suas taxas de polinização cruzada intermorfo e reduzindo a autogamia, o que pode ser entendido como padrão para espécies enantiofíticas.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Programa de Pós-graduação em Botânica da Universidade Federal Rural de Pernambuco pelo apoio financeiro e ao Centro de Referência para Recuperação de Áreas Degradadas (CRAD-UNIVASF) pelo apoio logístico.

Referências bibliográficas

- Almeida Jr, E. B. et al. 2009. Caracterização da vegetação de restinga da RPPN de Maracaípe, PE, Brasil, com base na fisionomia, flora, nutrientes do solo e lençol freático. - *Acta Botânica Brasílica* 23(1): 36-48.
- Almeida, N. M. 2012. Comportamento dos visitantes e padrões de deposição e captação de pólen para estimativa do fitness reprodutivo. - In: Leal I. R., Meiado M. V., Rabbani A. R. C. and Siqueira Filho J. A. (eds.), *Ecologia da Caatinga: Curso de campo 2011*. Gráfica Printpex, pp. 353-366.
- Almeida, N. M. et al. (2013)a. Enantiostyly in *Chamaecrista ramosa* (Fabaceae-Caesalpinioideae): floral morphology, pollen transfer dynamics and breeding system. - *Plant Biology* 15: 369-375.
- Almeida, N. M. et al. (2013)b. Floral polymorphism in *Chamaecrista flexuosa* (Fabaceae-Caesalpinioideae): a possible case of atypical enantiostyly? - *Annals of Botany* 112 (6): 1117-1123.
- Arroyo, M.T.K. 1981. Breeding systems and pollination biology in Leguminosae. - In: Polhill, R. M., Raven, P. H. (eds.), *Advances in Legume Systematics. Part 2*. Royal Botanic Gardens, Kew, pp.723-769.
- Ayres, M. et al. (2007) *BioEstat: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas*. Belém, Sociedade civil Mamirauá.
- Bahadur B., P.V. Kumar and N.P. Reddy. 1979. Enantiostyly in *Cassia* L. (Caesalpinioideae) together with SEM studies of pollen and its possible significance. - In: *Reproduction in flowering plants. Abstract International Symposium*.

- Bahadur, B. et al. 1990. S.E.M. studies of pollen in relation to enantiostyly and heteranthery in *Cassia* (Caesalpinaceae). - Journal Palynology, Silver Jubilee Commemoration 26: 17-22.
- Barrett, S. C. H., 2002. The evolution of plant sexual diversity. - Nature Reviews Genetics 3: 274–284.
- Barrett, S. C. H. 2003. Mating strategies in flowering plants: the outcrossing-selfing paradigm and beyond. - Philosophical transactions of the Royal Society of London - Series B 358: 991- 1004.
- Buchman, S.L. 1983. Buzz pollination in angiosperms. - In: Jones, C. E., Little, R. J., (eds.), Handbook of Experimental Pollination. Van Nostrand Reinhold, pp.73-113.
- Carvalho, D. A. and Oliveira, P.E., 2003. Biologia reprodutiva e polinização de *Senna sylvestris* (Vell.) H. S. Irwin and Barneby (Leguminosae, Caesalpinioideae). - Revista Brasileira de Botânica 26: 319–328.
- Costa, C. B. et al. 2007. Postzygotic reproductive isolation between sympatric taxa in the *Chamaecrista desvauxii* complex (Leguminosae-Caesalpinioideae). - Annals of Botany 99: 625–635.
- Delgado, S. A. and Souza, S. M. 1997. Biologia floral do gênero *Cassia* en La region de Los Tuxtlas, Vera Cruz. - Boletin de la Sociedad Botanica de Mexico 37: 5–45.
- Dutra, V. F. et al. 2009. Fenologia reprodutiva, síndromes de polinização e dispersão em espécies de Leguminosae dos campos rupestres do Parque Estadual do Itacolomi, Minas Gerais, Brasil. - Rodriguesia 60: 371–387.
- Ganders, F. R. 1979. The biology of heterostyly. - New Zealand Journal of Botany 17: 607-635.

- Gómez, G. A. et al. 2010. Anther and stigma morphology in mirror-image flowers of *Chamaecrista chamaecristoides* (Fabaceae): implications for buzz pollination. - *Plant Biology* 13(1): 19-24.
- Gottsberger, G. and Silberbauer-Gottsberger, I. 1988. Evolution of flower structures and pollination in Neotropical Cassiinae (Caesalpinaceae) species. - *Phyton* 28: 293-320.
- Harder, L. D. and Barrett, S. C. H. 1995. Mating cost of large floral displays in hermaphrodite plants. - *Nature* 373: 512-515.
- INMET (Instituto Nacional de Meteorologia). 2005. Disponível em www.inmet.gov.br. (Acessado em: 20/11/2009).
- Jesson, L. K. and Barrett, S. C. H. 2002. Solving the puzzle of mirror-image flowers. - *Nature* 417: 707.
- Kohn, J. R. et al. 1996. Reconstruction of the evolution of reproductive characters in Pontederiaceae using phylogenetic evidence from chloroplast DNA restriction-site variation. - *Evolution* 50: 1454-1469.
- Laporta, C. 2005. Floral biology and reproductive system of enantiostylous *Senna corymbosa* (Caesalpinaceae). - *Revista de Biologia Tropical* 53: 49-61.
- Leite, A. V. and Machado, I. C. 2010. Reproductive biology of woody species in caatinga, a dry forest of northeastern Brazil. - *Journal of Arid Environments* 74: 1374-1380.
- Lloyd, D. G. 1992. Self- and cross-fertilization in plants. The selection of self-fertilization. - *International Journal of Plant sciences* 153: 370-380.
- Martin, F. W. 1959. Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. - *Stain Technol* 34: 125-128.

- Nascimento, C. E. S. et al. 2003. Phytosociology of the remaining xerophytic woodland associated to an environmental gradient at the banks of the São Francisco river - Petrolina, Pernambuco, Brazil. - *Revista Brasileira de Botânica* 26: 271-287.
- Nascimento, E. A. and Del-Claro, K. 2007. Floral Visitors of *Chamaecrista debilis* (Vogel) Irwin and Barneby (Fabaceae- Caesalpinioideae) at Cerrado of Estação Ecológica de Jataí, São Paulo State, Brazil. - *Neotropical Entomology* 36(4): 619-624.
- Owens, S. J. and Lewis, G. P. 1989. Taxonomic and functional implications of stigma morphology in species of *Cassia*, *Chamaecrista*, and *Senna* (Leguminosae: Caesalpinioideae). - *Plant Systematics and Evolution* 163: 93-105.
- Seavey, S. R. and Bawa, K. S., 1986. Late-acting self-incompatibility in Angiosperms. - *Botanical Review* 52: 195-219.
- SUDENE. 1990. Dados pluviométricos do Nordeste – Pernambuco. Série pluviométrica. Superintendência para o Desenvolvimento do Nordeste, Recife.
- Teixeira, A. H. C., 2001. *Informações agrometeorológicas do Pólo Petrolina-PE/Juazeiro-BA*. Petrolina: Embrapa Semiárido.
- Webb, C. J. and Lloyd, D. G. 1986. The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigmas in Angiosperms II. Hecogamy. - *New Zealand Journal of Botany* 24: 163-178.
- Westerkamp, C. 2004. Ricochet pollination in cassias – and how bees explain enantiostyly. - In: Freitas B. M. and Pereira J. O. P. (eds.), *Solitary bees: conservation, rearing and management for pollination*. Imprensa Universitária, pp. 225–230.
- Wille, A. 1963. Behavioral adaptations of bees for pollen collecting from *Cassia* flowers. - *Revista de Biología Tropical* 11: 205-210.

Vallejo-Marín, M. et al. 2009. Division of labour within flowers: heteranthery, a floral strategy to reconcile contrasting pollen fates. - *Journal of Evolutionary Biology* 22: 828–839.

Vogel, S., 1978. Evolutionary shifts from reward to deception in pollen flowers. In: Richards, A. J., (ed.), *The pollination of flowers by insects*. Academic Press, London, pp.89-96.

Tabela 1. Resultados do sistema reprodutivo de sete espécies enantiostíflicas da subtribo Cassiinae. CA=*C. amiciella*; CC=*C. calycioides*; CREP=*C. repens*; CROT=*C. rotundifolia*; SMC=*S. macranthera*; SMP=*S. macranthera* var. *pubibunda*; SMT=*S. martiana*; SMT#=*S. martiana* (vibração com diapasão); SMT**=*S. martiana* (vibração com barbeador elétrico); PN=Polinização Natural; AM=Autopolinização Manual; AE=Autopolinização espontânea; PC INTRA=Polinização Cruzada Intramorfo; PC INTER=Polinização Cruzada Intermorfo; Frutos/Flores/% sucesso; Teste qui-quadrado ou G <p=0,05.

	PN		AM		AE		PC INTRA		PC INTER	
	D	E	D	E	D	E	*Dxd	*Exe	*Dxe	*Exd
CA	7/23/30	7/17/41	4/27/15	5/22/23	0/22	0/28	11/21/52	8/22/36	12/25/48	8/17/47
CREP	15/37/40	23/43/53	15/35/43	11/38/29	0/20	0/22	10/28/36	9/28/32	6/25/24	8/27/30
CROT	18/47/38	16/43/37	8/35/23	7/32/22	0/32	0/36	10/23/43	10/26/38	7/21/33	8/23/35
CC	33/41/80	36/40/90	13/35/37	6/19/31	0/35	0/22	5/20/25	6/18/33	11/21/52	9/22/41
SMC	10/32/31	12/30/40	3/28/11	3/27/11	0/24	0/27	7/18/39	9/22/41	8/20/40	7/21/33
SMP	5/58/9	7/64/11	0/27/0	0/25	0/33	0/32	18/22/82	14/25/56	9/18/50	7/20/35
SMT	2/20/10	2/17/12	1/43/2	0/35	0/45	0/45	4/40/10	1/42/2	2/43/5	2/37/5
SMT#	-	-	0/12	0/15	-	-	1/10/10	0/10	0/15	1/17/6
SMT**	-	-	0/16	0/18	-	-	1/12/8	1/13/8	2/14/14	1/15/7

*Doador x receptor.

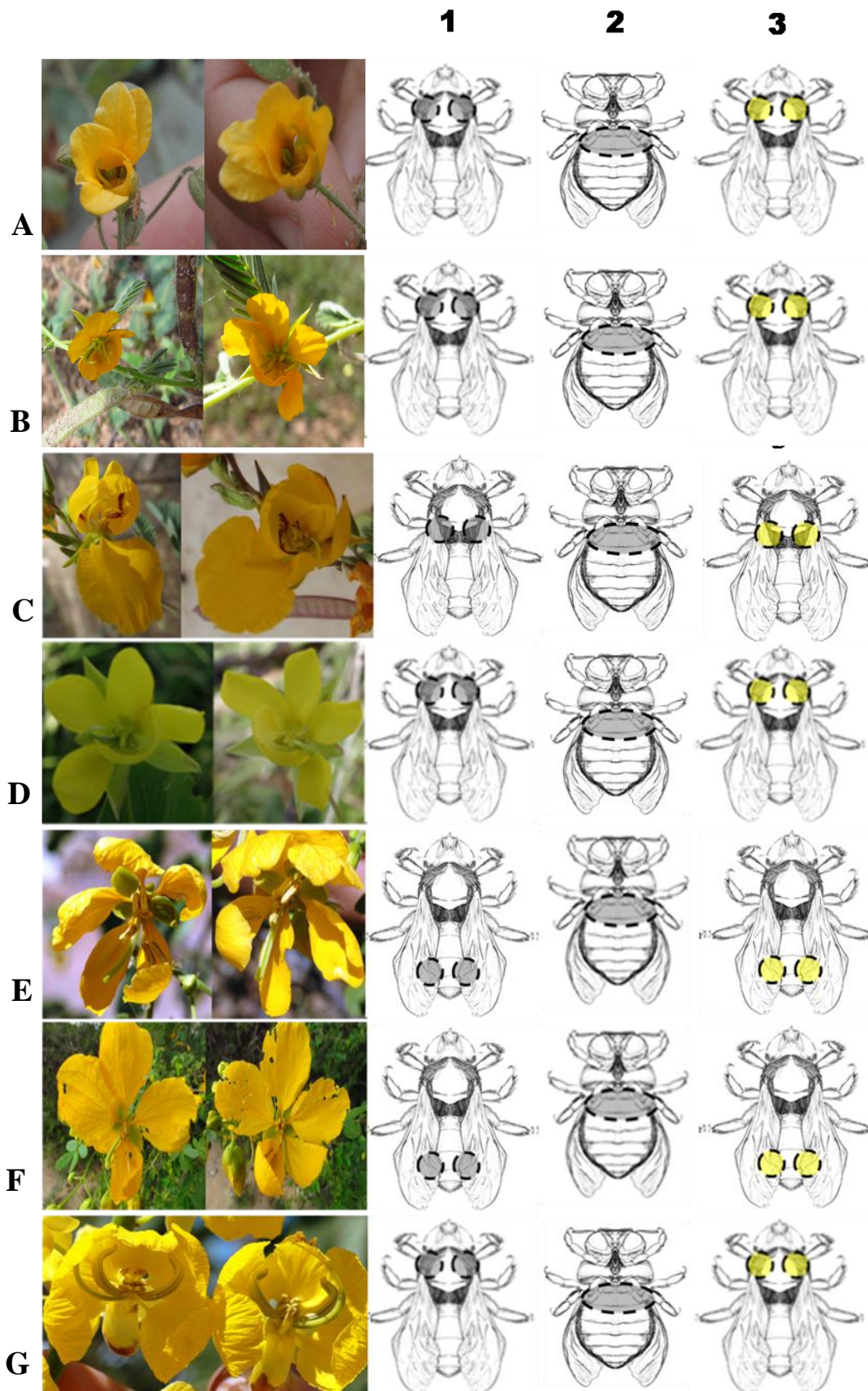


Figura 1. Locais de deposição e captação do pólen. 1) deposição das anteras de polinização; 2) deposição das anteras de alimentação; e 3) captação de pólen no corpo dos polinizadores de seis espécies enantiostílicas da subtribo Cassiinae. A) *Chamaecrista amiciella*; B) *C. calycioides*; C) *C. repens*; D) *C. rotundifolia*; E) *Senna macranthera*; F) *S. macranthera* var. *pudibunda*; G) *S. martiana*.

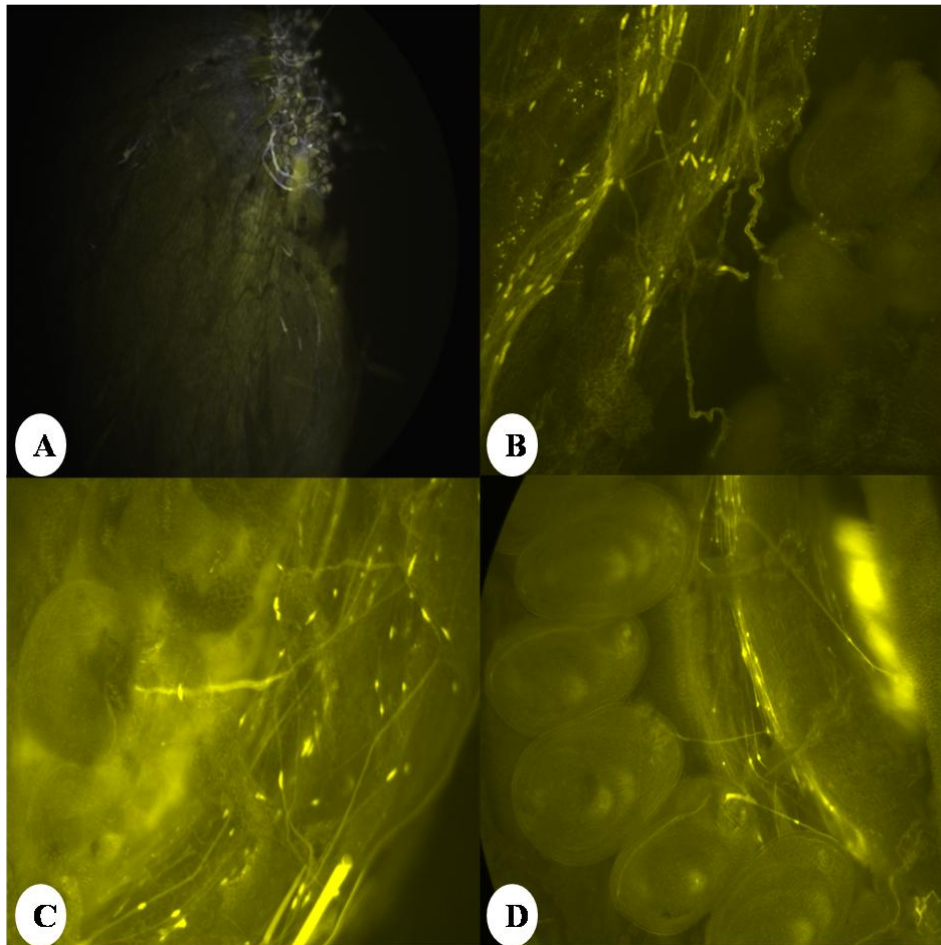


Figura 2. Tubos polínicos provenientes de polinizações cruzadas manuais intra e intermorfo penetrando em pistilos e óvulos de espécies enantiostíflicas da subtribo Cassiinae. A) *Senna martiana* (Polinização Cruzada Intramorfo); B) *S. macranthera* (Polinização Cruzada Intramorfo); C) *S. macranthera* var. *pubibunda* (Polinização Cruzada Intermorfo); D) *Chamaecrista repens* (Polinização Cruzada Intermorfo).

Capítulo 3

Tipos enantiostílicos e heteranteria em espécies da subtribo Cassiinae (Fabaceae- Caesalpinioideae)

Manuscrito a ser enviado ao periódico American Journal of Botany

Tipos enantiostílicos e heteranteria em espécies da subtribo Cassiinae (Fabaceae-Caesalpinioideae)

Natan Messias de Almeida¹; José Alves de Siqueira Filho²; Paulo Eugênio de Oliveira³
& Cibele Cardoso de Castro⁴

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

²Universidade Federal do Vale do São Francisco, Rodovia BR 407, 12 Lote 543, Projeto
de Irrigação Nilo Coelho, s/n, C1, Petrolina, PE, Brasil, 56300-000.

³Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia, Av. Pará, 1720, Umuarama,
Uberlândia, MG, Brasil, 38405-382.

⁴Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Avenida Bom Pastor, s/n, Boa Vista, Garanhuns, PE, Brasil, 55292-270.

Título resumido: Tipos enantiostílicos e heteranteria em espécies da subtribo Cassiinae

Autor para correspondência: cibelection@hotmai.com

Resumo

Espécies da subtribo Cassiinae (*Cassia*, *Senna* e *Chamaecrista*) apresentam grande diversidade de tipos florais, mas esta diversidade não se reflete nos seus mecanismos reprodutivos, representados principalmente pela enantiofilia e pela heteranetia. Contudo, variações nestes mecanismos vem sendo relatadas para este grupo, tais como tipo e local da deposição e captação do pólen e anteras diferenciadas por tamanho, coloração e posicionamento das anteras e poros. Este trabalho teve como objetivo investigar a ocorrência de diferentes padrões dos mecanismos reprodutivos da enantiofilia e da heteranetia em espécies da subtribo Cassiinae, avaliando seus caracteres morfológicos e funcionais. Os dados foram coletados em flores e botões frescos e fixados em álcool 70%, bem como por meio de fotografias e material herborizado reidratado. Os parâmetros utilizados para o estabelecimento dos tipos enantiofílicos foram tipo de polinização (notofílica ou estrotofílica), natureza da deposição de pólen pelas anteras no polinizador (recíproca ou generalizada), tipo de deposição (direta ou indireta), número de pétalas utilizadas na deposição de pólen (nenhuma, única ou conjunto de pétalas) e condução do pólen (nenhuma, ricochete ou “looping”). Para determinar o tipo de heteranetia foram utilizados os seguintes parâmetros das anteras: coloração, posicionamento, tamanho, posicionamento dos poros e ocorrência de afunilamento da porção apical. A análise de similaridade de tais características morfológicas e funcionais possibilitou o reconhecimento de sete tipos enantiofílicos os quais, em parte, assemelham-se aos clados construídos a partir de estudos filogenéticos. Todas as formas de heteranetia foram observadas nas espécies analisadas. Para espécies de *Chamaecrista* a forma posicionamento do poro (PP) foi a mais ocorrente, e as espécies de *Senna* apresentaram, em sua maioria, a forma posicionamento das anteras (PA). O reconhecimento dos diferentes tipos de enantiofilia e sua relação com as formas de heteranetia é importante para o entendimento dos mecanismos e estratégias reprodutivas deste grupo de plantas, podendo ser estendidos às demais espécies enantiofílicas.

Palavras-chave: Deposição e captação de pólen, mecanismos reprodutivos,

Introdução

A subtribo Cassiinae, que comporta os gêneros *Cassia* L., *Chamaecrista* Moench. e *Senna* Mill., possui grande diversidade morfológica de flores (Irwin e Barneby, 1982; Dulberger e Bawa, 1994; Tucker, 1996; Marazzi et al., 2006, 2007; Marazzi e Endress, 2008). Tal diversidade funciona como um mecanismo pré-zigótico de incompatibilidade que minimiza as chances de formação de híbridos em espécies sincronopátricas (Moyle et al., 2004; Conceição et al., 2006; Costa et al., 2007), já que flores de espécies distintas podem atrair os mesmos grupos de polinizadores. Apesar da ocorrência deste amplo espectro de formas florais, o mecanismo reprodutivo da subtribo Cassiinae não difere muito entre as espécies (Gottsberger e Silberbauer-Gottsberger, 1988; Carvalho e Oliveira, 2003; Ribeiro e Lovato, 2004; Westerkamp, 2004; Laporta, 2005; Urrutia e Hokche, 2008; Almeida, 2012; Almeida et al., 2013a; Almeida et al., 2013b). As diferenças ocorrem, aparentemente, nas estratégias relacionadas à enantioestilia (Carvalho e Oliveira, 2003; Westerkamp, 2004; Almeida, 2012; Almeida et al., 2013a, b).

A enantioestilia, caracterizada pela existência de dois morfos florais que diferem entre si pelo deslocamento do gineceu em relação ao eixo floral, é muito frequente na subtribo Cassiinae (Carvalho e Oliveira, 2003; Westerkamp, 2004; Gómez et al., 2011; Almeida et al., 2013a; Almeida et al., 2013b), especialmente o tipo monomórfico (indivíduos que produzem os dois morfos florais; Barrett, 2002). As variações funcionais da enantioestilia monomórfica resultantes da diversidade morfológica de flores deste grupo são relacionadas ao tipo de polinização (nototríbica ou esternotríbica), de deposição do pólen no corpo do polinizador (direta ou indireta) e nos locais específicos ou não de deposição de pólen (Carvalho e Oliveira, 2003; Westerkamp, 2004; Laporta, 2005; Almeida et al., 2013a,b)

A heteranteria constitui outro aspecto que contribui para a diversidade morfológica floral nas espécies da subtribo Cassiinae e que influencia a funcionalidade da enantioestilia no grupo (Carvalho e Oliveira, 2003; Westerkamp, 2004; Gómez et al., 2011; Almeida et al., 2013a, b). Espécies com heteranteria possuem flores que oferecem pólen como recompensa aos visitantes florais e dois grupos de estames com funções distintas de alimentação e polinização (Vogel, 1978). Estas diferentes funções podem ser identificadas pelo posicionamento, forma e tamanho dos estames, coloração diferenciada e posicionamento dos poros das anteras (Vallejo-Marín et al., 2009;

Almeida et al., 2013a). Este mecanismo parece ter relações evolutivas com espécies enantiostílicas que possuem flores de pólen sendo comum em espécies de *Cassia*, *Senna* e *Chamaecrista* (Vogel, 1978; Buchmann, 1983; Gottsberger e Silberbauer – Gottsberger, 1988; Westerkamp, 2004; Laporta, 2005; Almeida, 2012; Almeida et al., 2013a). Além de possibilitar a deposição de pólen em locais específicos do corpo dos polinizadores viabilizando a enantiostilia, a presença de estames com diferentes funções é fundamental para afastar o risco de limitação polínica (Vogel, 1978; Barrett, 2002; Vallejo-Marín et al., 2009).

Características florais tais como simetria, posicionamento dos elementos sexuais e características das pétalas podem constituir elementos importantes na delimitação de grupos de espécies desta subtribo (Marazzi e Endress, 2008). As espécies de *Chamaecrista* e *Senna* passaram por um arranjo taxonômico realizado por Irwin e Barneby (1982), onde os mesmos foram agrupados em seções e séries. Contudo, estudos mais atuais estão promovendo rearranjos nestes táxons, pela utilização da biologia molecular aliada a caracteres morfológicos (Marazzi et al. 2006; Conceição et al. 2009).

Este estudo tem como objetivo investigar padrões morfo-funcionais relacionados à enantiostilia e à heteranteria em espécies da subtribo Cassiinae. A nossa hipótese é de que essas espécies apresentam variações nesses padrões, em virtude da alta diversidade morfológica encontrada nas suas flores.

Material e métodos

Espécies estudadas

Foram avaliadas 62 espécies (Tabela 1) por meio da observação de flores e botões em estado natural e fixados em álcool 70%, bem como fotografias e/ou material herborizado do Herbário do Vale do São Francisco (HVASF). De todas as espécies analisadas, 33 foram por meio de material fresco, fixado e fotografia, 16 por material herborizado e fotografia e 13 por material herborizado. Quando necessário, na análise por meio de material herborizado, flores foram reidratadas para melhor visualização das estruturas. Foram selecionadas sete espécies-modelo para a formação dos grupos. Para estas espécies foram coletados dados mais detalhados, tais como horário de antese e comportamento dos visitantes florais para melhor descrição dos padrões da enantiostilia (Almeida et al. 2013a, b; Almeida dados não publicados).

Padrões da enantioestilia

Para a delimitação de grupos enantioestílicos, foram utilizados cinco caracteres:

- a) Tipo de polinização - Deposição e captação do pólen no dorso (nototríbica) ou no ventre do visitante (esternotríbica);
- b) Natureza da deposição - Deposição pelas anteras de polinização no mesmo local do contato com o estigma (generalizada) ou em local oposto (recíproca);
- c) Tipo de deposição - Deposição realizada por meio do contato das anteras de polinização com os visitantes (direta) ou sem esse contato (indireta).
- d) Número de pétalas utilizadas na deposição - Deposição direta de pólen pela antera (nenhuma); uma pétala contacta o polinizador em local oposto ao do contato com o estigma (única); uma pétala não é suficiente para contactar o polinizador em local oposto ao do contato com o estigma, sendo necessário o envolvimento de outra(s) pétala(s) neste processo (conjunto).
- e) Condução do pólen - Deposição direta de pólen pelas anteras de polinização (nenhuma); deposição indireta na qual a distância entre os poros das anteras de polinização e o local da deposição é igual ao comprimento da pétala ou conjunto de pétalas que auxiliam na polinização, fazendo com que os grãos de pólen permaneçam em contato com a (s) pétalas por mais tempo (“looping”; Almeida et al., 2013a); a área de contato do pólen com a pétala que auxilia na deposição é pontual (ricochete; Westerkamp 2004; Almeida, dados não publicados).

Tipos de heteranteria

As espécies foram classificadas quanto a diferenças na coloração (CO), posicionamento (PA), tamanho (TA), posicionamento dos poros das anteras (PP), bem como ocorrência de afunilamento da porção apical das mesmas (AA).

Análises estatísticas

Para agrupar as espécies em tipos enantioestílicos, em tipos de heteranteria e para verificar a relação entre essas duas características foi realizada uma análise de similaridade de Jaccard utilizando a ferramenta estatística PAST (Hammer et al., 2001).

Resultados

Padrões da enantioestilia

A análise de similaridade das características morfológicas e funcionais das flores entre as espécies permitiu a criação de sete tipos enantioestílicos, descritos a seguir (Figura 1). As espécies-modelo para cada tipo tiveram seus epítetos específicos utilizados para nomeá-los (Figura 2).

- a) Tipo ramosa ou 1 (*Chamaecrista ramosa*) – Deposição nototribica, recíproca, indireta do tipo “looping”, realizada por um conjunto de pétalas (Figura 2A);
- b) Tipo repens ou 2 (*Chamaecrista repens*) - Deposição nototribica, generalizada, indireta do tipo “looping”, realizada por um conjunto de pétalas (Figura 2B);
- c) Tipo acosmifolia ou 3 (*Chamaecrista acosmifolia* var. *acosmifolia*) - Deposição nototribica, recíproca, indireta do tipo “looping”, realizada por uma única pétala (Figura 2C);
- d) Tipo macranthera ou 4 (*Senna macranthera* var. *pudibunda*) - Deposição nototribica, recíproca e direta (Figura 2D);
- e) Tipo cana ou 5 (*Senna cana*)- Deposição nototribica, generalizada e direta (Figura 2E);
- f) Tipo martiana ou 6 (*Senna martiana*) - Deposição nototribica, generalizada, indireta do tipo ricochete, realizada por uma única pétala (Figura 2F);
- g) Tipo flexuosa ou 7 (*Chamaecrista flexuosa*) - Deposição esternotribica, generalizada e direta (Figura 2G).

O tipo ramosa (1) foi o que teve maior número de espécies representantes (n=20, 32%, sendo 19 *Chamaecrista* e uma *Senna*), e o tipo cana (5) foi o menos representado, com apenas duas espécies (3,2%) (*Senna cana* e *S. lechriosperma*; Figura 1). Os tipos martiana (6), acosmifolia (3), repens (2), macranthera (4) e flexuosa (7) apresentaram 3 (5%), 13 (21%), 3 (5%), 12 (19,5%) e 6 (9,6%) espécies respectivamente. Os tipos macranthera (4), cana (5) e martiana (6) foram representados apenas por espécies do gênero *Senna*, e no tipo flexuosa (7) o gênero *Chamaecrista* foi representado apenas pela espécie-modelo, *Chamaecrista flexuosa* (Figura 1).

As espécies *Cassia fistula*, *Chamaecrista nictitans* e *Senna occidentalis* não apresentaram enantioestilia.

Houve maior afinidade entre os tipos ramosa (1) e repens (2), que apresentaram em segunda ordem similaridade com o tipo acosmifolia (3, Figura 1). Dentre os tipos mais comumente observados em *Senna*, os tipos 5 e 7 apresentaram-se com maior similaridade (Figura 1).

Tipos de heteranteria

Todos os tipos de heteranteria foram observados nas espécies analisadas (Figura 3), sendo representado por apenas uma, duas ou até três formas de visualização da heteranteria. A heteranteria por PP foi a mais frequente (25 espécies, 40% do total; 23 *Chamaecrista* e 2 *Senna*), seguida por PA (9 espécies, 14%; 9 *Senna*), igualmente ao tipo TA-PA (9 espécies, 14% espécies; 1 *Cassia*, 2 *Chamaecrista*, 6 *Senna*). Os tipos TA, PA-AA e TA-PA-AA ocorreram em quatro espécies cada (8%) todas do gênero *Senna*, sendo seguidos por TA-CO (3 espécies 4,5%; 3 *Chamaecrista*), TA-PP-AA (2, espécies 3%; 2 *Senna*) e TA-PP (1 espécie, 1,5%; 1 *Chamaecrista*).

A espécie *Chamaecrista flexuosa* não apresentou heteranteria.

Tipos enantiostílicos x tipos de heteranteria

O grupo mais representado foi o que inclui o tipo enantiostílico ramosa (1) e heteranteria PP (20 espécies, 32,25%), seguido pelo tipo acosmifolia (3) e heteranteria PP (oito espécies, 13%) e pelo tipo macranthera (4) e heteranteria PA (cinco espécies, 8%) (Figura 4).

Discussão

O reconhecimento de sete tipos enantiostílicos em espécies de Cassiinae aparece como uma grande inovação nos estudos envolvendo a enantiostilia. Mesmo sendo conhecido há mais de um século, este mecanismo reprodutivo ainda encontra-se relativamente desconhecido (Thorp e Estes, 1975; Jesson e Barrett, 2002), sendo a diferenciação entre tipos realizada de forma generalizadora.

A enantiostilia é classificada como monomórfica e dimórfica (quanto à existência de morfos recíprocos em um único indivíduo ou em indivíduos distintos, respectivamente). Na monomórfica são reconhecidos os tipos randômico (quando a distribuição do morfos ocorre de forma aleatória) e não randômico (quando esta distribuição obedece a um padrão, Barrett, 2002). Outra forma de separação dos tipos de

enantiostilia se baseia no posicionamento dos estames em relação ao deslocamento do gineceu: recíprocas quando os estames encontram-se opostos ao gineceu, e não recíprocas quando isso não ocorre (Jesson e Barrett, 2003). Esta última classificação não parece adequada, porque os morfos são funcionalmente recíprocos: o posicionamento distinto dos poros das anteras, associado à deposição indireta de pólen com a utilização das pétalas resulta na deposição de pólen em locais opostos no corpo dos polinizadores (Almeida et al. 2013a).

A formação de sete tipos enantiostílicos refletiu a diversidade morfológica ocorrente nas espécies da subtribo Cassiinae, resultando em diferentes formas e locais de deposição e captação do pólen no corpo do polinizador (Irwin & Barneby, 1982; Dulberger e Bawa, 1994; Tucker, 1996; Marazzi et al., 2006; Marazzi et al., 2007; Marazzi e Endress, 2008; Almeida et al. 2013a; Almeida et al. 2013b). O resultado desta diversidade levou ao reconhecimento de diferentes níveis de complexidade da enantiostilia nas espécies estudadas.

O tipo ramosa mostrou a maior complexidade da enantiostilia e também o maior número de espécies no total e dentro do gênero *Chamaecrista*, que compõem a maior parte deste grupo (95%). Neste tipo existe a obrigatoriedade da deposição e captação do pólen em lados opostos no dorso dos polinizadores através da deposição indireta do pólen, utilizando um conjunto de pétalas, o que foi verificado na espécie-modelo (Almeida et al. 2013a). O tipo acosmifólia (3) pode ser considerado o segundo mais complexo por apresentar os mesmos mecanismos do tipo ramosa, exceto a utilização das pétalas na deposição do pólen; trata-se do único tipo encontrado tanto em *Chamaecrista* como em *Senna*. Com isso, pode-se atribuir para algumas espécies do gênero *Senna* alto nível de complexidade reprodutiva. Contudo, a maior parte das espécies deste gênero agrupou-se em tipos enantiostílicos menos complexos, ou seja, sem deposição indireta de pólen (Carvalho e Oliveira, 2003; Laporta, 2005; Almeida, 2012) ou, quando apresentam, é generalizada, não recíproca (Almeida, dados não publicados).

Os tipos repens (2), martiana (6) e flexuosa (7) não apresentaram deposição recíproca de pólen e, portanto, podem ser consideradas enantiostílicas atípicas, assim como observado em *Chamaecrista flexuosa* (Almeida et al. 2013b). Nesta espécie, que constitui o primeiro registro de enantiostilia atípica, a ocorrência do desvio no padrão enantiostílico está relacionada a um aumento na área de captação de pólen no corpo dos

polinizadores. Conseqüentemente, há elevação da aptidão reprodutiva da espécie, o que pode estar ocorrendo com as espécies componentes dos grupos enantiostílicos supracitados.

Comparando nossos resultados no agrupamento dos tipos enantiostílicos para as espécies de *Chamaecrista* com os que utilizaram dados morfológicos e moleculares para agrupamento taxonômicos neste gênero (Irwin e Barneby 1982; Conceição *et al.* 2009), encontramos semelhanças na formação dos clados. Na avaliação das seções propostas por Irwin e Barneby (1982) representadas nos tipos enantiostílicos, encontramos um padrão semelhante de distribuição nos clados obtidos no estudo de Conceição e colaboradores (2009), que utilizaram dados morfológicos e moleculares para formação dos grupos propostos. No tipo ramosa (1) foram observadas espécies representantes das seções *Chamaecrista*, *Xerocalyx*, *Caliciopsis*, *Absus*, assemelhando-se ao clado “D” construído pelos autores no estudo anterior, diferindo apenas pela presença da seção *Apoucoutia*, representada por uma única espécie. Da mesma forma, os clados “H” e “I” assemelharam-se aos tipos enantiostílicos repens (2) e flexuosa (7) pela presença de espécies apenas da seção *Chamaecrista*. O tipo acosmifolia (3) é representado apenas por espécies da seção *Absus*, sendo semelhante ao clado “C”, com exceção de uma espécie da seção *Grimaldia* encontrado pelos autores neste clado. Contudo, os autores sugerem que representantes da seção *Grimaldia* migrem para a seção *Absus*, o que elevaria a semelhança entre o tipo acosmifolia (3) e o clado “C”.

Similarmente ao observado para as espécies de *Chamaecrista*, os tipos enantiostílicos com maior representatividade em *Senna* são semelhantes a clados propostos em estudos a filogenia desse gênero (Marazzi *et al.* 2006). Algumas das espécies de *Senna* ocorrentes no tipo acosmifolia (3) representaram parte do clado “III” no estudo supracitado, particularmente nas espécies da seção *Perianisia* (Irwin e Barneby 1982). Da mesma forma, espécies do tipo macranthera (4) estão representados no clado “IVb” de Marazzi e colaboradores (2006), por espécies da seção *Chamaefistula* (Irwin e Barneby 1982). Os tipos cana (5) e flexuosa (7), assemelham-se aos clados “V” e “I” (Marazzi *et al.* 2006) respectivamente, pela presença de espécies compartilhadas exclusivamente da seção *Chamaefistula* (Irwin e Barneby 1982). O tipo martiana (6) apresentou-se semelhante ao clado “II” (Marazzi *et al.* 2006) pela partilha de espécies da seção *Senna* (Irwin e Barneby 1982).

O caráter taxonômico pode estar atuando nas espécies de *Chamaecrista* e *Senna* analisadas neste estudo, já que apenas no tipo *acosmifolia* (3) espécies dos dois gêneros ocorrem em número semelhante, sendo os demais tipos mais representados por espécies de um dos gêneros. Além disso, espécies ocorrentes nos tipos enantiostílicos compartilham as mesmas seções propostas por Irwin e Barneby (1982) para espécies de *Chamaecrista* e *Senna*. Novos clados em novos estudos com os gêneros *Chamaecrista* (Conceição et al. 2009) e *Senna* (Marazzi et al. 2006), onde os autores propõem modificações nos arranjos taxonômicos das espécies, também são compartilhados pelas espécies do nosso estudo, o que evidencia a importância do caráter taxonômico no reconhecimento da funcionalidade reprodutiva das espécies. Contudo, espécies de diferentes tipos enantiostílicos podem ocorrer em diferentes gêneros, seções e clados, demonstrando convergência adaptativa para espécies de *Chamaecrista* e *Senna*.

Os tipos de heteranteria aqui observadas já foram descritas para espécies dos gêneros *Cassia*, *Chamaecrista* e *Senna*, sendo elas coloração, posicionamento, tamanho e posicionamento dos poros das anteras (Gottsberger e Silberbauer-Gottsberger, 1988; Carvalho e Oliveira, 2003; Ribeiro e Lovato, 2004; Westerkamp, 2004; Laporta, 2005; Urutia e Hokche, 2008; Almeida, 2012; Almeida et al., 2013a; Almeida et al., 2013b). Contudo, a ocorrência de afunilamento da porção apical das anteras (AA) como forma de separação das funções das anteras não havia sido observada em outros estudos.

O novo modo de expressão da heteranteria aqui descrito (afunilamento das anteras) ocorreu apenas em espécies de *Senna*, e tem como possível funcionalidade elevar a pressão interior das anteras fazendo com que o jato de grãos de pólen atinja maior velocidade e força, o que favoreceria a adesão e direcionamento dos grãos no corpo dos polinizadores, evitando um efeito “ducha”, espalhando os grãos em diversas partes do corpo dos visitantes. Esta forma da heteranteria em *Senna* substitui a utilização das pétalas observada em *Chamaecrista*, as quais auxiliam a deposição do pólen em locais específicos e um possível aumento na velocidade do jato de grãos de pólen pelo efeito ricochete e “looping” ocorrente em representantes deste gênero (Todd, 1882; Gottsberger e Silberbauer-Gottsberger, 1988; Westerkamp, 2004; Almeida et al. 2013a). O afunilamento das anteras é, portanto, um parâmetro importante para a definição das funções das anteras, já que anteras de alimentação não necessitam desta modificação estrutural para desempenhar o papel de depositar pólen no animal visitante.

A maior ocorrência da forma posicionamento do poro (PP) em espécies de *Chamaecrista* está praticamente restrita a este grupo possivelmente pelo tamanho reduzido das flores destas espécies quando comparadas a flores de espécies de *Senna*. Neste caso, a diferenciação apenas pelo posicionamento dos poros permite o posicionamento das anteras em um mesmo local, tornando-se visualmente mais atrativo aos polinizadores. Esta forma de heteranteria foi proposta por Almeida e colaboradores (2013a) em estudo envolvendo a espécie *Chamaecrista ramosa*, uma das espécies utilizadas como modelo neste estudo. Flores da maioria das espécies de *Senna* neste estudo apresentaram grandes dimensões, elevando sua atratividade visual. Com isso, não há necessidade da presença de estames adensados para atração dos polinizadores, sendo justificada a ocorrência de heteranteria pelo posicionamento das anteras, o que já havia sido relatado em outros estudos envolvendo espécies deste gênero (Carvalho e Oliveira, 2003; Laporta, 2005; Almeida, 2012).

A relação encontrada do tipo ramosa (1) com a heteranteria por posicionamento do poro (PP) decorre da dependência de flores de espécies do gênero *Chamaecrista* com esta forma de heteranteria para funcionamento da enantiofilia, já discutida anteriormente, assim como a relação entre os tipos que abrigam na sua maioria espécies de *Senna* e a heteranteria por posicionamento da antera (PA).

O reconhecimento dos diferentes tipos de enantiofilia e a relação com as formas de heteranteria nas espécies da subtribo Cassiinae abre diversas possibilidades de estudos envolvendo a funcionalidade dos mecanismos e estratégias reprodutivas deste grupo de plantas, podendo ser estendidos às demais espécies, e demonstra a diversidade de estratégias reprodutivas desenvolvidas por espécies enantiofilas.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de N. M Almeida e pelo auxílio financeiro concedido a C. C. Castro (Programa de Apoio e Desenvolvimento da Botânica, PNAB), ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal Rural de Pernambuco pelo apoio financeiro e ao Centro de Referência para Recuperação de Áreas Degradadas (CRAD-UNIVASF) pelo apoio logístico.

Referências bibliográficas

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

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

ALMEIDA, N. M., C. C. CASTRO, A. V. LEITE, R. R. NOVO, AND I. C. MACHADO. 2013b. Floral polymorphism in *Chamaecrista flexuosa* (Fabaceae-Caesalpinioideae): a possible case of atypical enantiostyly? *Annals of Botany* (Print) 112 (6): 1117-1123.

ARCEO-GÓMEZ, G., M. L. MARTÍNEZ, V. PARRA-TABLA AND J. G. GARCÍA-FRANCO. 2011. Anther and stigma morphology in mirror-image flowers of *Chamaecrista chamaecristoides* (Fabaceae): implications for buzz pollination. *Plant Biology* 13(1): 19-24.

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

BUCHMAN, S.L. 1983. Buzz pollination in angiosperms. In C.E. Jones and R.J. Little [eds.], *Handbook of Experimental Pollination*, 73-113. Van Nostrand Reinhold, New York, United States.

CARVALHO, D. A., AND P. E. OLIVEIRA. 2003. Biologia reprodutiva e polinização de *Senna sylvestris* (Vell.) (Leguminosae, Caesalpinioideae). *Revista Brasileira de Botânica* 26: 319–328.

CONCEIÇÃO, A. DE S., L. P. DE QUEIROZ, AND E. L. BORBA. 2008. Natural hybrids in *Chamaecrista* sect. *Absus* subsect. *Baseophyllum* (Leguminosae-Caesalpinioideae): genetic and morphological evidence. *Plant Systematic and Evolution* 271: 19–27.

COSTA, C. B. N., S. M. LAMBERT, E. L. BORBA AND L. P. DE QUEIROZ. 2007. Postzygotic reproductive isolation between sympatric taxa in the *Chamaecrista desvauxii* complex (Leguminosae-Caesalpinioideae). *Annals of Botany* 99: 625–635.

DULBERGER, R., M. B. SMITH, AND K. S. BAWA. 1994. The stigmatic orifice in *Cassia*, *Senna*, and *Chamaecrista* (Caesalpinioideae): morphological variation, function during pollination, and possible adaptive significance. *American Journal of Botany* 81: 1390-1396.

GOTTSBERGER, G., AND I. SILBERBAUER-GOTTSBERGER. 1988. Evolution of flower structures and pollination in Neotropical Cassiinae (Caesalpinioideae) species. *Phyton* 28: 293-320.

IRWIN, H.S., AND R. C. BARNEBY. 1982. The American Cassiinae. *Memoirs of the New York Botanical Garden* 35:1-918.

JESSON, L. K., AND S. C. H. BARRETT. 2002. Enantiostyly in *Wachendorfia* (Haemodoraceae); the influence of reproductive systems on the maintenance of the polymorphism. *Am. J. Bot.* 89, 253–263.

JESSON, L. K., AND S. C. H. BARRETT. 2003. The comparative biology of mirror-image flowers. *Int. J. Sci.*, 164 (5 Suppl.): 237-249.

LAPORTA, C. 2005. Floral biology and reproductive system of enantiostylous *Senna corymbosa* (Caesalpinaceae). *Revista de Biologia Tropical* 53: 49-61.

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

MARAZZI, B., P. K. ENDRESS, L. P. QUEIROZ, AND E. CONTI. 2006. Phylogenetic relationships within *Senna* (Leguminosae, Cassiinae) based on three chloroplast DNA regions: patterns in the evolution of floral symmetry and extrafloral nectaries. *American Journal of Botany* 93: 288-303.

MARAZZI, B., AND P. K. ENDRESS. 2008. Patterns and development of floral asymmetry in *Senna* (leguminosae, cassiinae). *American Journal of Botany* 95(1): 22–40.

MOYLE, C. L., M. S. OLSON, AND P. TIFFIN. 2004. Patterns of reproductive isolation in three angiosperm genera. *Evolution* 58: 1195-1208.

RIBEIRO, R.A., AND M. B. LOVATO. 2004. Mating system in a neotropical tree species, *Senna multijuga* (Fabaceae). *Genetics and Molecular Biology* 27(3): 418-424.

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

TODD, J.E. 1882. On the flowers of *Solanum rostratum* and *Cassia chamaecrista*. *American Naturalist* 16: 281– 287.

TUCKER, S. C. 1996. Trends in evolution of floral ontogeny in *Cassia* sensu stricto, *Senna*, and *Chamaecrista*. *American Journal of Botany* 83: 687 – 711.

URUTIA, E., AND O. HOKCHE. 2008. Aspectos de la biología reproductiva de dos especies de *Chamaecrista* Moench (Caesalpinioideae – Leguminosae). *Acta Botanica Venezuelica* 31 (2): 461-472.

WESTERKAMP, C. 2004. Ricochet pollination in cassias – and how bees explain enantiostyly. In B. M. Freitas AND J.O.P. Pereira (eds.), *Solitary bees: conservation, rearing and management for pollination*, 225-230. Imprensa Universitária, Fortaleza, Brazil.

VALLEJO-MARÍN, M., J. S. MANSON, J. D. THOMSON, AND S. C. H. BARRETT. 2009. Division of labour within flowers: heteranthery, a floral strategy to reconcile contrasting pollen fates. *Journal of Evolutionary Biology* 22: 828–839.

VOGEL, S. 1978. Evolutionary shifts from reward to deception in pollen flowers. In A. J. Richards (ed.), *The pollination of flowers by insects*, 89-96. Academic Press, London, England.

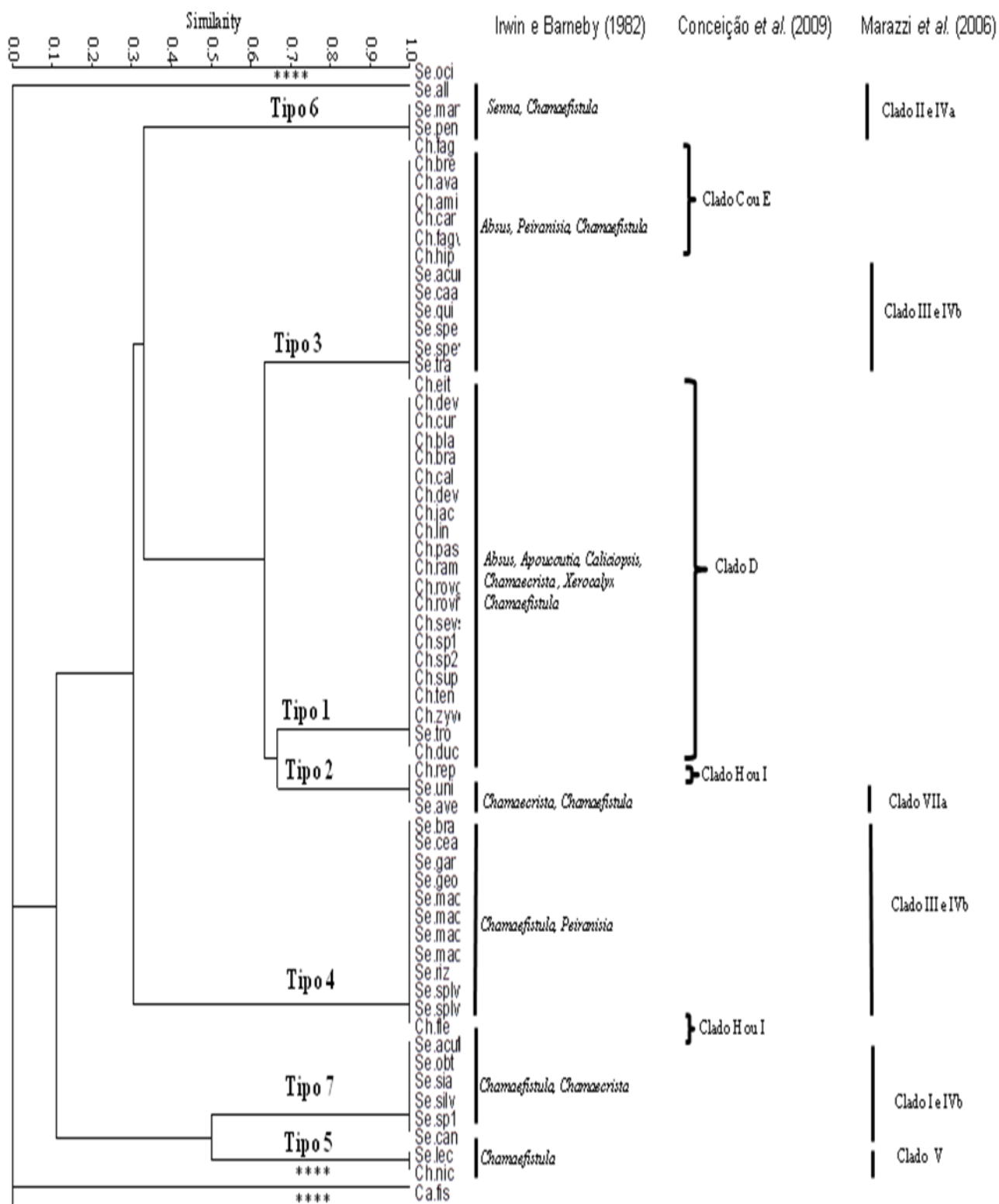


Figura 1. Análise de similaridade (Jaccard) de espécies enantiostílicas em relação aos tipos enantiostílicos baseados em características morfológicas e funcionais das flores. ***= espécies sem enantiostilia. Seções de *Senna* e *Chamaecrista* de Irwin & Barneby (1982), classificações propostas por Conceição et al. (2009) para *Chamaecrista* e por Marazzi et al. (2006) para *Senna*.

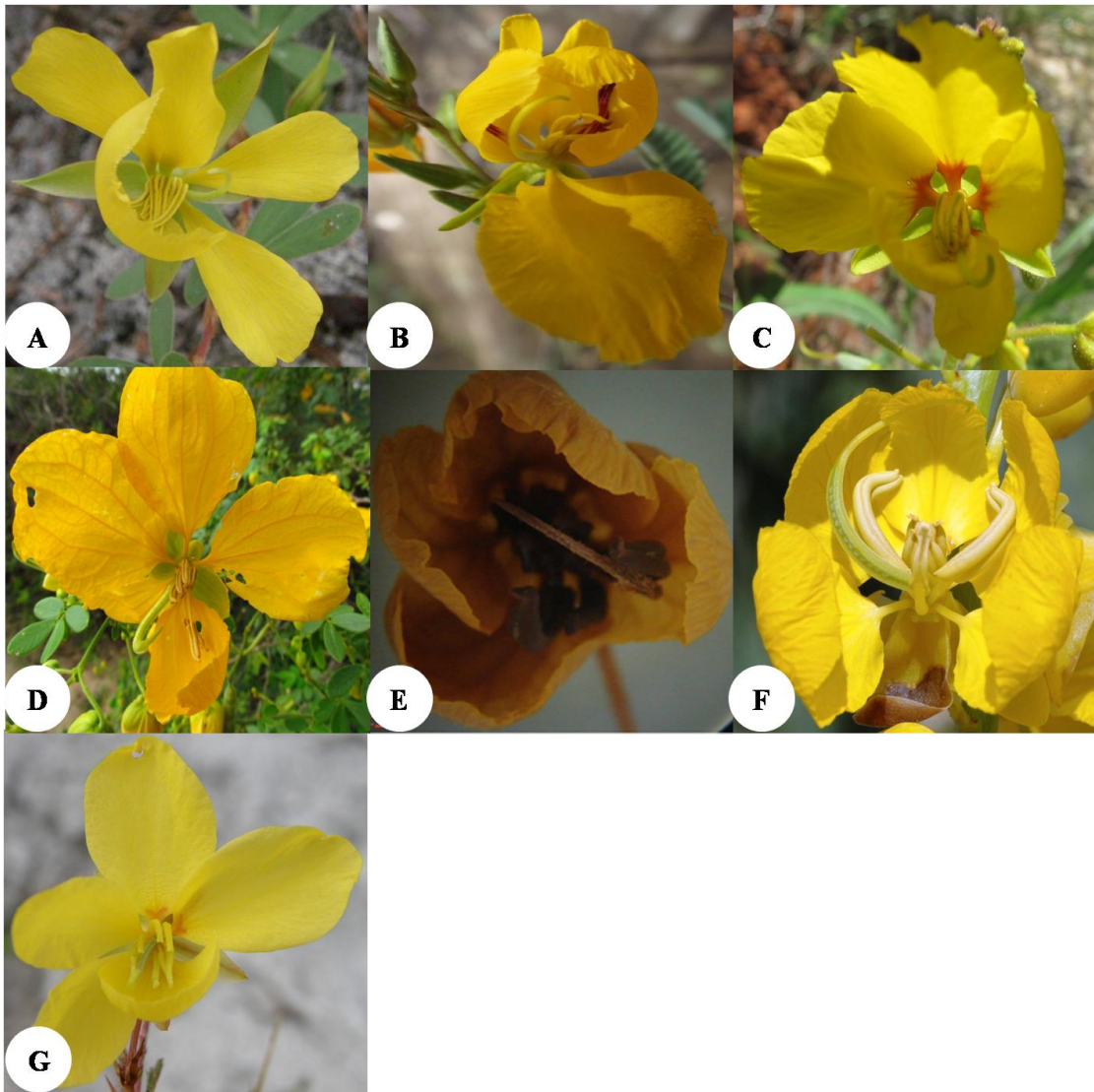


Figura 2. Flores de espécies da subtribo Cassiinae representantes dos tipos de enantiostilia. A) *Chamaecrista ramosa* (tipo ramosa); B) *C. repens* (tipo repens); C) *C. acosmifolia* var. *acosmifolia* (tipo *acosmifolia*); D) *Senna macranthera* var. *pudibunda* (tipo *macranthera*); E) *S. cana* (tipo *cana*); F) *S. martiana* (tipo *martiana*); G) *C. flexuosa* (tipo *flexuosa*).

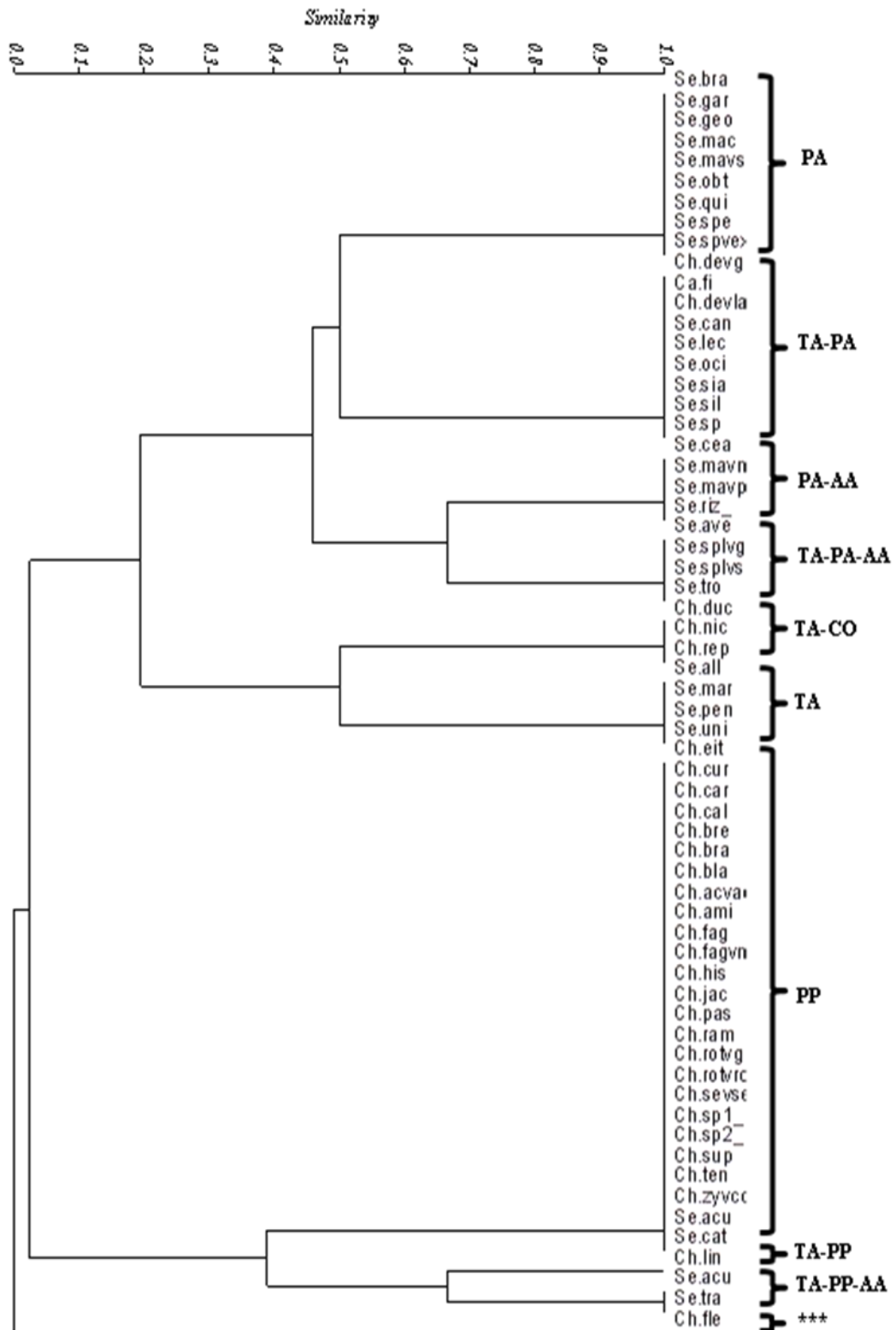


Figura 3. Análise de similaridade (Jaccard) de espécies enantiostílicas em relação aos tipos de heteranteria baseados em características morfológicas e funcionais do androceu. TA= tamanho das anteras; CO= coloração das anteras; PA= posicionamento das anteras; PP= posicionamento dos poros das anteras; AA= afunilamento das anteras; ***= espécie sem heteranteria.

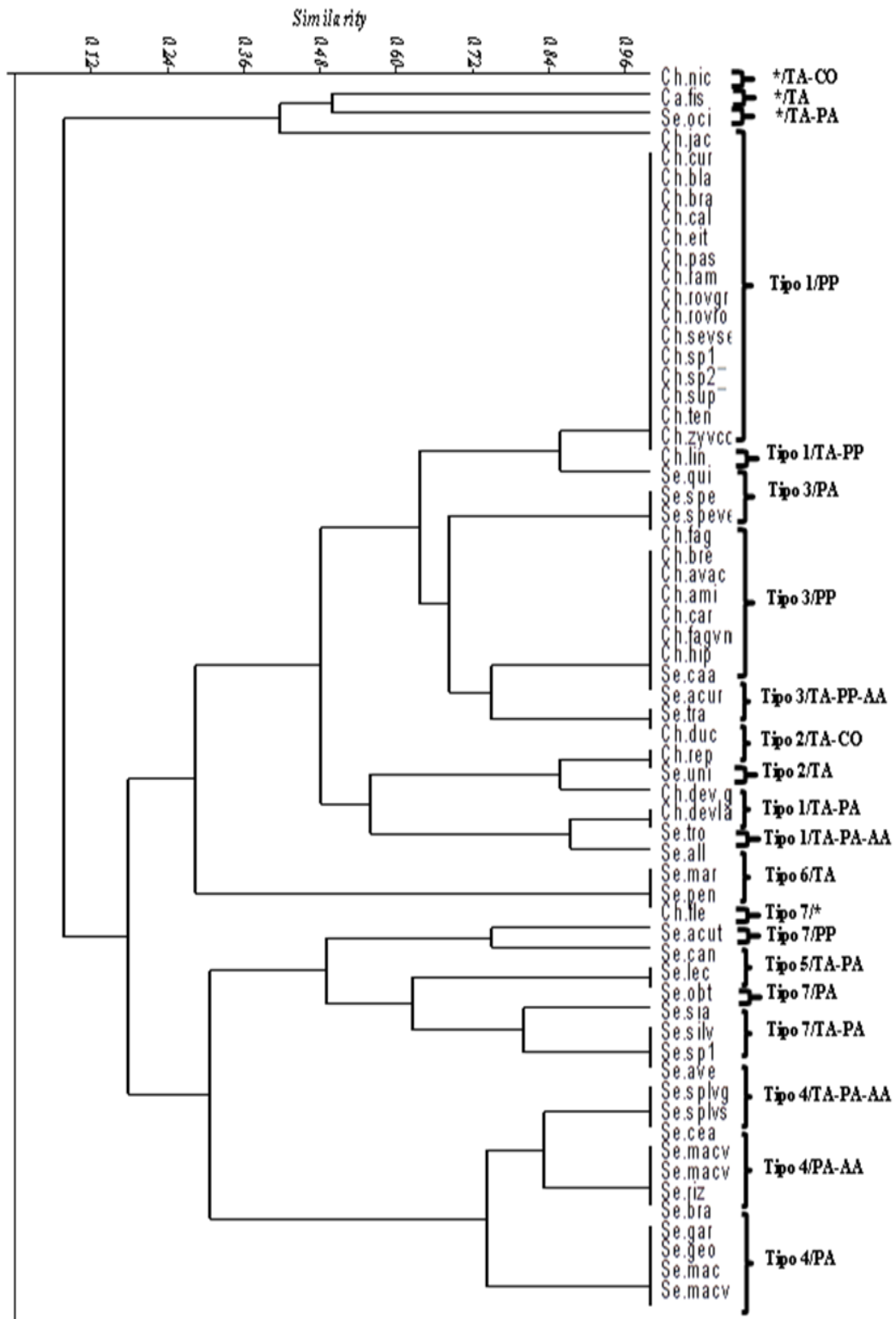


Figura 4. Análise de similaridade (Jaccard) de espécies enantiostílicas em relação à interação entre os tipos enantiostílicos (baseados em características morfológicas e funcionais das flores) e os tipos de heteranteria (baseados em características do androceu). TA= tamanho das anteras; CO= Coloração das anteras; PA= posicionamento das anteras; PP= posicionamento dos poros das anteras; AA= afunilamento das anteras. *= espécies sem enantiostilia.

Tabela 1. Espécies de Cassiinae, suas respectivas abreviações e a origem do material utilizado.

Espécies	Abreviação das espécies	Origem do material	Voucher (HVASF)
<i>Cassia fistula</i>	<i>Ca.fi</i>	fresco/fixado/fotografia	T.S. Oliveira 037, 05/10/2011
<i>Chamaecrista acosmifolia</i> var. <i>acosmifolia</i>	<i>Ch.acvac</i>	fresco/fixado/fotografia	N.M. Almeida 522, 25/04/2013
<i>Chamaecrista amiciella</i>	<i>Ch.ami</i>	fresco/fixado/fotografia	N.M. Almeida 519, 10/04/2013
<i>Chamaecrista blanchetii</i>	<i>Ch.bla</i>	herborizado	Marcondes Oliveira 4249, 28/05/2009
<i>Chamaecrista brachystachya</i>	<i>Ch.bra</i>	herborizado/fotografia	D.P. Souza 075, 18/12/2013
<i>Chamaecrista brevicalyx</i>	<i>Ch.bre</i>	herborizado/fotografia	V.M. Cotarelli 1691, 12/04/2012
<i>Chamaecrista calycioides</i>	<i>Ch.cal</i>	fresco/fixado/fotografia	V.M. Cotarelli 1853, 19/06/2012
<i>Chamaecrista carobinha</i>	<i>Ch.car</i>	herborizado/fotografia	J. Paula-Souza 9975, 10/07/2009
<i>Chamaecrista curvifolia</i>	<i>Ch.cur</i>	herborizado	F. Socolowski 156, 03/09/2012
<i>Chamaecrista desvauxii</i> var. <i>graminea</i>	<i>Ch.devgr</i>	herborizado/fotografia	J.A. Siqueira Filho 1813, 22/09/2006
<i>Chamaecrista desvauxii</i> var. <i>latifolia</i>	<i>Ch.devla</i>	herborizado	Marcondes Oliveira 3605, 07/10/2008
<i>Chamaecrista duckeana</i>	<i>Ch.duc</i>	herborizado	J.R. Maciel 1008, 28/04/2009
<i>Chamaecrista eitenorum</i>	<i>Ch.eit</i>	herborizado/fotografia	Marcondes Oliveira 3606, 07/10/2008
<i>Chamaecrista fagonioides</i>	<i>Ch.fag</i>	fresco/fixado/fotografia	Marcondes Oliveira 4614, 20/01/2010
<i>Chamaecrista fagonioides</i> var. <i>macrocalyx</i>	<i>Ch.fagvma</i>	herborizado/fotografia	J.A. Siqueira Filho 1763, 21/09/2006
<i>Chamaecrista flexuosa</i>	<i>Ch.fle</i>	fresco/fixado/fotografia	Marcondes Oliveira 3607, 07/10/2008
<i>Chamaecrista hispidula</i>	<i>Ch.his</i>	herborizado	Marcondes Oliveira 3424, 11/06/2008
<i>Chamaecrista jacobinae</i>	<i>Ch.jac</i>	herborizado/fotografia	Marcondes Oliveira 4657, 27/01/2010
<i>Chamaecrista linearis</i>	<i>Ch.lin</i>	herborizado/fotografia	V.M. Cotarelli 1486, 14/03/2012
<i>Chamaecrista nictitans</i>	<i>Ch.nic</i>	fresco/fixado/fotografia	V.M. Cotarelli 1581, 10/04/2012
<i>Chamaecrista pascuorum</i>	<i>Ch.pas</i>	herborizado	Marcondes Oliveira 3508, 11/09/2008
<i>Chamaecrista ramosa</i>	<i>Ch.ram</i>	fresco/fixado/fotografia	C.R.S. Oliveira 129, 25/01/2012
<i>Chamaecrista repens</i>	<i>Ch.rep</i>	fresco/fixado/fotografia	V.M. Cotarelli 1563, 10/04/2012
<i>Chamaecrista rotundifolia</i> var. <i>grandiflora</i>	<i>Ch.rotvgr</i>	fresco/fixado/fotografia	J.A. Siqueira Filho 2373, 15/07/2010
<i>Chamaecrista rotundifolia</i> var. <i>rotundifolia</i>	<i>Ch.rotvro</i>	fresco/fixado/fotografia	N.M. Almeida 527, 26/04/2013
<i>Chamaecrista serpens</i> var. <i>serpens</i>	<i>Ch.sevse</i>	fresco/fixado/fotografia	N.M. Almeida 509, 10/04/2013

<i>Chamaecrista</i> sp1.	<i>Ch.sp1</i>	herborizado/fotografia	N.M. Almeida 529, 21/12/2011
<i>Chamaecrista</i> sp2.	<i>Ch.sp2</i>	herborizado	N.M.P. Braga 118, 14/06/2012
<i>Chamaecrista supplex</i>	<i>Ch.sup</i>	fresco/fixado/fotografia	N.M. Almeida 520, 11/04/2013
<i>Chamaecrista tenuisepala</i>	<i>Ch.ten</i>	fresco/fixado/fotografia	N.M. Almeida 516, 10/04/2013
<i>Chamaecrista zygophylloides</i> var. <i>colligans</i>	<i>Ch.zyvco</i>	herborizado/fotografia	V.D. Silva 078, 28/01/2009
<i>Senna acuruensis</i>	<i>Se.acu</i>	fresco/fixado/fotografia	A.C.P. Oliveira 1878, 08/11/2012
<i>Senna acutisepala</i>	<i>Se.acu</i>	herborizado/fotografia	P.B. Schwartzburd 2425, 27/03/2011
<i>Senna alata</i>	<i>Se.all</i>	fresco/fixado/fotografia	N.M. Almeida 390, 12/12/2012
<i>Senna aversiflora</i>	<i>Se.ave</i>	herborizado	Marcondes Oliveira 3578, 12/09/2008
<i>Senna bracteosa</i>	<i>Se.bra</i>	herborizado/fotografia	Marcondes Oliveira 4001, 27/04/2009
<i>Senna cana</i>	<i>Se.can</i>	fresco/fixado/fotografia	V.M. Cotarelli 786, 01/07/2011
<i>Senna catingae</i>	<i>Se.cat</i>	herborizado	A.C.P. Oliveira 2811, 10/07/2013
<i>Senna cearensis</i>	<i>Se.cea</i>	herborizado	Marcondes Oliveira 4154, 25/05/2009
<i>Senna gardneri</i>	<i>Se.gar</i>	herborizado/fotografia	J.A. Siqueira Filho 2050, 26/05/2009
<i>Senna georgica</i>	<i>Se.geo</i>	herborizado/fotografia	L.M. Nascimento 752, 17/11/2008
<i>Senna lechriosperma</i>	<i>Se.lec</i>	fresco/fixado/fotografia	V.M. Cotarelli 1791, 05/06/2012
<i>Senna macranthera</i>	<i>Se.mac</i>	fresco/fixado/fotografia	A.C.P. Oliveira 2500, 07/05/2013
<i>Senna macranthera</i> var. <i>micans</i>	<i>Se.mavmi</i>	fresco/fixado/fotografia	N.M. Almeida 526, 25/04/2013
<i>Senna macranthera</i> var. <i>pubibunda</i>	<i>Se.mavpu</i>	fresco/fixado/fotografia	Marcondes Oliveira 2966, 19/07/2007
<i>Senna macranthera</i> var. <i>striata</i>	<i>Se.mavst</i>	fresco/fixado/fotografia	Marcondes Oliveira 3684, 11/10/2008
<i>Senna martiana</i>	<i>Se.mar</i>	fresco/fixado/fotografia	N.M. Almeida 269, 04/09/2012
<i>Senna obtusifolia</i>	<i>Se.obt</i>	fresco/fixado/fotografia	N.M. Almeida 510, 10/04/2013
<i>Senna occidentalis</i>	<i>Se.oci</i>	fresco/fixado/fotografia	N.M. Almeida 443, 10/01/2013
<i>Senna pendula</i>	<i>Se.pen</i>	herborizado/fotografia	F. Socolowski 127, 01/08/2012
<i>Senna quinquangulata</i>	<i>Se.qui</i>	herborizado	L.M. Nascimento 675, 17/04/2008
<i>Senna rizzinii</i>	<i>Se.riz</i>	fresco/fixado/fotografia	N.M. Almeida 523, 25/04/2013
<i>Senna siameae</i>	<i>Se.sia</i>	fresco/fixado/fotografia	A.C.P. Oliveira 2339, 28/01/2013
<i>Senna silvestris</i>	<i>Se.sil</i>	herborizado/fotografia	D. Araújo 690, 27/05/2009
<i>Senna</i> sp1.	<i>Se.sp</i>	fresco/fixado/fotografia	Sem Voucher

<i>Senna spectabilis</i>	<i>Se.spe</i>	fresco/fixado/fotografia	N.M. Almeida 373, 11/12/2012
<i>Senna spectabilis</i> var. <i>excelsa</i>	<i>Se.spvex</i>	herborizado	N.M. Almeida 294, 19/11/2012
<i>Senna splendida</i> var. <i>gloriosa</i>	<i>Se.splvgl</i>	fresco/fixado/fotografia	J.V.A. Ferreira 067, 30/05/2011
<i>Senna splendida</i> var. <i>splendida</i>	<i>Se.splvsp</i>	fresco/fixado/fotografia	N.M. Almeida 525, 25/04/2013
<i>Senna trachypus</i>	<i>Se.tra</i>	fresco/fixado/fotografia	N.M. Almeida 224, 29/08/2012
<i>Senna tropica</i>	<i>Se.tro</i>	herborizado	Marcondes Oliveira 4750, 27/01/2010
<i>Senna uniflora</i>	<i>Se.uni</i>	fresco/fixado/fotografia	V.M. Cotarelli 1627, 11/04/2012

Capítulo 4

Bicarpellate gynoecium in enantiostylous species of *Senna* Mill. (Fabaceae, Caesalpinioideae, Cassiinae): a new reproductive strategy?

Nota científica enviada ao periódico *Annals of Botany*

Bicarpellate gynoeceium in enantiostylous species of *Senna* Mill.(Fabaceae, Caesalpinioideae, Cassiinae): a new reproductive strategy?

Natan Messias de Almeida¹; José Alves de Siqueira Filho²; Paulo Eugênio de Oliveira³& Cibele Cardoso de Castro^{1,4}

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

²Universidade Federal do Vale do São Francisco, Rodovia BR 407, 12 Lote 543, Projeto de Irrigação Nilo Coelho, s/n, C1, Petrolina, PE, Brasil, 56300-000.

³Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia, Av. Pará, 1720, Umuarama, Uberlândia, MG, Brasil, 38405-382.

⁴Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Avenida Bom Pastor, s/n, Boa Vista, Garanhuns, PE, Brasil, 55292-270.

Running title: Bicarpellate gynoecium in *Senna* species

Corresponding author: cibelegastro@hotmail.com

Abstract

The evolution of the reproductive mechanisms found in Angiosperms is a result of selective pressures favoring the production of fruits and seeds. Flowers of *Senna* species have a broad morphological diversity; however no variations were reported in relation to the presence of a unicarpellate gynoecium that is characteristic of this plant group. This study records the occurrence of bicarpellate gynoecium in two enantiostylous *Senna* species in an area of dry forest (Caatinga) in NE Brazil. The species produce three floral types: left (L), right (R) and bicarpellate (B). The proportion of the three floral morphs was similar in the populations of *Senna macranthera* var. *micans*, but the number of B flowers in populations of *S. trachypus* was lower than that recorded for L and R ones. The occurrence of this morphological variation may be related to an enhancement of pollen capture and, in *S. trachypus*, also to the reduction of florivory by caterpillars that were observed eating sexual elements of the flowers.

Key-words: reproductive fitness, pluricarpellate, Fabaceae

Introduction

The reproductive structures and strategies of flowering plants are interpreted as being a result of selective pressures that favor their reproductive success (Barrett, 2002). Pluricarpellate gynoecium is not common within the Fabaceae (Endress & Doyle 2009, Prenner 2004), for example, and its occurrence may be interpreted as a strategy that maximizes pollen capture by the stigma and the reproductive success (Paulino et al. 2013). Similarly, enantiostylous flowers (Carvalho & Oliveira, 2003; Laporta, 2005) bearing a unicarpellate gynoecium (Queiroz, 2009) are very common in *Senna* species (Caesalpinioideae – Cassinae), but variations in the enantiostylous patterns are found in the genus and seem to enhance reproductive assurance (Almeida et al. 2013). Pluricarpellate gynoecium were recorded in *Bauhinia* and *Ceratonia* (Tucker 1988, 1992) and *Caesalpinia* and *Cassia* (Stergios & Aymard 2008), but not yet in *Senna*. This study records the occurrence of a bicarpellate gynoecium in two monomorphic, enantiostylous *Senna* species in an area of dry forest ('Caatinga') in NE Brazil.

Material and methods

Flowers of *S. macranthera* var. *micans* (five individuals, two populations) and of *Senna trachypus* (eleven individuals, one population) were collected at the municipalities of Mauriti and Brejo Santo (Ceará state, NE Brazil) and preserved in alcohol 70%. For each species, it was recorded the number of left, right and bicarpellate flowers, and this proportion was compared between floral morphs using the Chi-square test (software BioEstat 5.0, Ayres *et al.*, 2007). Samples of both species were deposited at the HVASF (Vale do São Francisco Herbarium; 21488 for *S. macranthera* var. *micans* and 16.792 for *Senna trachypus*).

Results and discussion

The proportions of the three floral morphs in the population of *S. macranthera* var. *micans* were similar (Table 1; Figure 1A-C), as well as those of R and L flowers of *Senna trachypus*; bicarpellate flowers of this species occurred in a lower proportion than when compared to the other floral morphs (Table 1; Figure 1D-F). The similar proportions of floral morphs (including variant ones) had already been reported in *Chamaecrista flexuosa*, considered an atypical enantiostylous species (Almeida et al. 2013); the production of an equilibrated number of floral morphs within the population

enhances its reproductive fitness. Similarly, it seems that the presence of two stigmas maximizes pollen receipt of *Senna* species studied here.

The presence of two fruits in *S. macranthera* var. *micans* streng then the idea that variations in patterns of reproductive features of plants are a result of selective pressures favoring the reproductive success; flowers with bicarpellate gynoecium produce more seeds (twice) than those bearing unicarpellate gynoecium. This data corroborates the study of Paulino et al. (2013), which recorded double fruits in the bicarpellate *Swartzia dipetala*.

It is important to note that the reproductive elements of *Senna trachypus* were consumed by caterpillars. The higher production of pistils may be interpreted as a strategy that compensates the losses caused by those herbivores, and also to satiate them more efficiently, thus reducing the chances of attack to other flowers of the population (Coley e Kursar, 1996). However, studies that measure the impact of florivory upon the reproductive biology of this species are needed to test this hypothesis.

References

- Almeida NM, Castro CC, Novo RR, Leite AV, Machado IC. 2013. Floral polymorphism in *Chamaecrista flexuosa* (Fabaceae-Caesalpinioideae): a possible case of atypical enantiostyly? *Annals of Botany* **112**(6):1117-1123.
- Ayres M, Ayres JrM, Ayres DL, Santos, ASS. 2007. *BioEstat 5.0. Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas*. Belém: Ong Mamirauá.
- Barrett SCH. 2002. The evolution of plant sexual diversity. *Nature Reviews Genetics* **3**: 274–284.
- 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.
- Coley PD, Kursar TA. 1996. *Antiherbivore defenses of young tropical leaves: Physiological constraints and ecological trade-offs*. In: Mulkey SS, Chazon RL, Smith AP, eds. *Tropical forest ecophysiology*. London: Chapman and Hall, 305-336.
- Endress PK, Doyle JA. 2009. Reconstructing the ancestral angiosperm flower and its initial specializations. *American Journal of Botany* **96**: 22-66.
- Laporta C. 2005. Floral biology and reproductive system of enantiostylous *Senna corymbosa* (Caesalpinaceae). *Revista de Biologia Tropical* **53**: 49-61.

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

Paulino JV, Mansano VF, Teixeira SP. 2013. Elucidating the unusual floral features of *Swartzia dipetala* (Fabaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **173**: 303-320.

Prenner G. 2004. Floral development in *Polygala myrtifolia* (Polygalaceae) and its similarities with Leguminosae. *Plant Systematics and Evolution* **249**: 67-76.

Table 1. Number of right, left and bicarpellate flowers of *Senna trachypus* and *S. macranthera* var. *micans* in an area of Caatinga, NE Brazil. Different letters in the same line indicate statistically different values (Qui-square test).

Species	Floral morph		
	Left	Right	Bicarpellate
<i>Senna trachypus</i> (n=11)	72 ^a	58 ^a	15 ^b
<i>S. macranthera</i> var. <i>micans</i> (n=5)	32 ^a	33 ^a	28 ^a

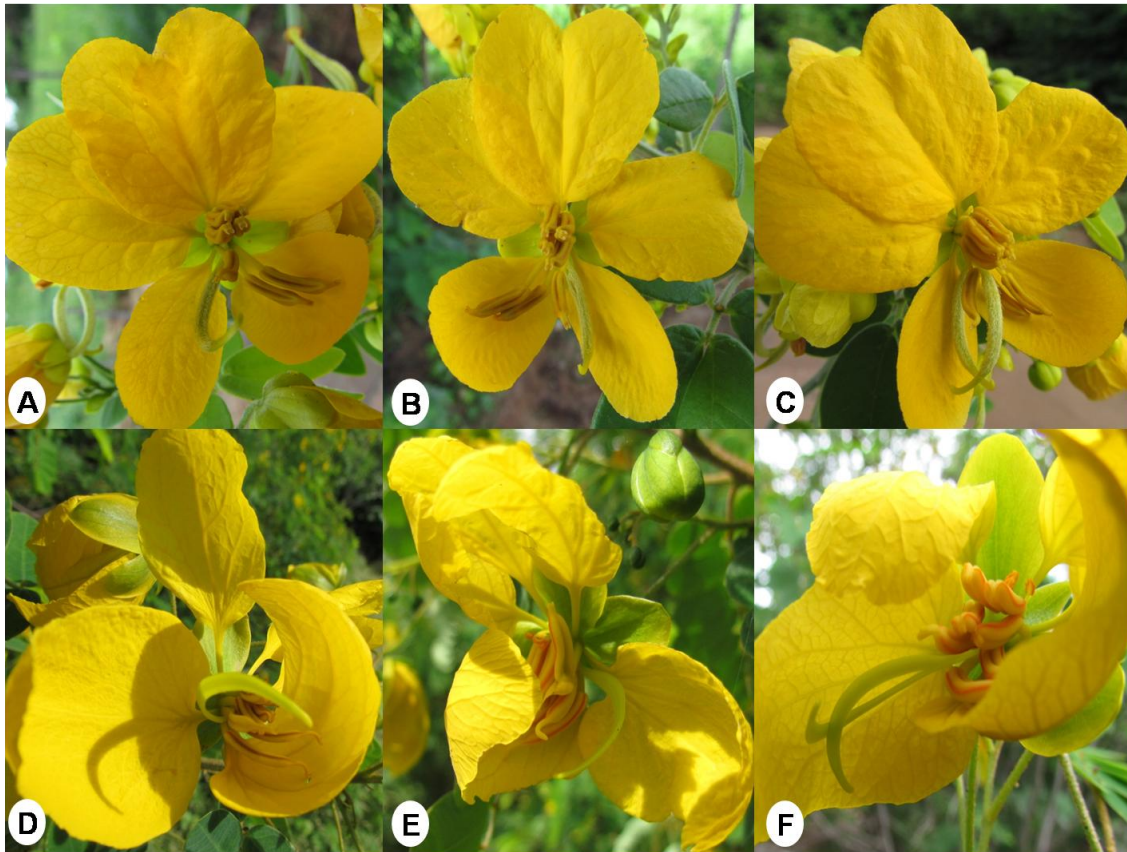


Figure 1. Flowers of *Senna macranthera* var. *micans* and *S. trachypus* bearing bicarpellate gynoecium in an area of Caatinga, NE Brazil. A-C: Left, right and bicarpellate flowers of *Senna macranthera* var. *micans*; D-F: Left, right and bicarpellate flowers of *Senna trachypus*.

8. Considerações finais

Os resultados encontrados nesta tese demonstram a importância da realização de estudos relacionados à estratégias de floração, reprodução e morfologia funcional em espécies enantiostílicas, principalmente representantes da subtribo Cassiinae. Mesmo sendo de conhecimento secular, a enantiostilia parece ainda apresentar vários aspectos a serem estudados e conseqüentemente levando a novos achados.

Apesar das diferentes estratégias na dinâmica de floração encontradas neste estudo, pela grande diversidade de espécies e morfologia floral neste grupo, em estudos futuros outras estratégias deverão ser encontradas, além do entendimento dos fatores que levam estas espécies a adotarem as mesmas. Contudo, o relatado neste estudo acerca deste tema, como a adoção da estratégia de produção diferenciada de flores dos morfos recíprocos por parte dos indivíduos e a alternância nas categorias de funcionalidade, adiciona grande conhecimento em áreas ainda não exploradas.

A adoção de mecanismos de incompatibilidade morfológicos e não fisiológicos pelas espécies estudadas, mostra a importância da morfologia floral para a reprodução de espécies enantiostílicas e conseqüentemente dos estudos voltados para a investigação funcional das distintas formas florais. Alguns estudos anteriores voltaram os seus esforços para análises fisiológicas, deixando de lado experimentos envolvendo as características morfológicas tão marcantes e decisivas reprodutivamente das espécies enantiostílicas. A junção de testes envolvendo características fisiológicas como experimentos do sistema reprodutivo e migração dos tubos polínicos, com experimentos envolvendo a morfologia floral, realizados neste estudo, trazem informações valiosas da funcionalidade dos mecanismos reprodutivos utilizados pelas plantas.

Ficou evidente neste estudo que o modelo estabelecido e divulgado da enantiostilia pode sofrer grandes variações, especialmente em um grupo tão diversificado como os das Cassiinae. O entendimento já relatado da enantiostilia como elevadora das taxas de xenogamia e redutora das taxas de autogamia e geitonogamia foi confirmado neste estudo, mas podem-se visualizar pelos tipos de enantiostilia propostos os diferentes meios encontrados pelas espécies para alcançar esta funcionalidade.

Por ter enveredado por diferentes aspectos dos estudos acerca das espécies enantiofílicas, esta tese trouxe informações relevantes dos diferentes temas abordados, auxiliando no preenchimento de grandes lacunas existentes no conhecimento dos mecanismos de reprodução singulares de representantes da subtribo Cassiinae e de espécies enantiofílicas.

9. Anexos

9.1 Normas para publicação no periódico *Plant Biology*

Authors are encouraged to provide additional information as supplementary material that will be accessible online. Please identify the supplementary material as such in the manuscript.

Submission of Manuscripts

Please submit your manuscript online at <http://mc.manuscriptcentral.com/plabio> (*Plant Biology* no longer accepts submissions made by post or e-mail).

To submit a manuscript through ScholarOne Manuscripts, please follow these instructions:

1. If you do not yet have an account, click on 'Create Account'. You will then be sent a password by e-mail. If you already have an account, enter your user ID and password and click on 'Log In'. (Note: if necessary you can change your password under 'Edit My Account'.)
2. On the welcome page, click on 'Corresponding Author Center'.
3. You then reach the 'Author Center Dashboard', click on the star icon for manuscript submission.
4. Follow the steps 1-7 until manuscript submission is completed. The main document including title, abstract, key words (MS Word file), tables (MS Word files) and figures (*.eps, *.tif or *.jpg files) are loaded onto the system as individual files. (Note: you may also interrupt the online submission and continue at a later time.)
5. Submission of your manuscript will be confirmed by an e-mail that will give you the 'Manuscript ID Number'. Please refer to this number in all correspondence with the editorial office. Should you encounter difficulties submitting a manuscript to ScholarOne Manuscripts, please contact the editorial office by e-mail at annette.schlierenkamp@ctp.uni-freiburg.de or by telephone ++49(0)761/203-8300. Help is also available on the introductory page of ScholarOne Manuscripts in the form of an 'Online User's Guide'. To access the guide, click on 'Get Help Now' in the top right-hand corner.

Online production tracking is now available for your article through Wiley-Blackwell's Author Services

Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor/> for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

Conditions for Publication

Please note that *Word 2007* is not yet compatible with journal production systems. Unfortunately, the journal cannot accept Microsoft Word 2007 documents until such time as a stable production version is released. Please use Word's 'Save As' option therefore to save your document as an older (.doc) file type.

Research papers may be submitted that have not been published previously, even as a summary. Concise presentation is required. Although the non-specialist reader should be kept in mind when abstracts, introductions and discussions are written, lengthy review type introductions and speculative discussions should be avoided. Experimental methods should be explained in detail except for standard procedures. Diffuse and repetitive style should be avoided. Illustrations and tables should be limited to the truly essential material.

Plant Biology preferentially publishes **short research papers** (five printed pages maximum) that will be reviewed with high priority. **Concise review articles** that synthesize the state of the art in an original way are highly desirable for this journal. **Acute views** contributions should contain brief comments on an actual problem.

NEW: Pre-submission English-language editing

Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscripts professionally edited before submission to improve the English. A list of independent suppliers of editing services can be found at www.blackwellpublishing.com/bauthor/english_language.asp. All services are paid for

and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

Length of Papers

Papers should not exceed 8 printed pages or 9,000 words. One printed page in the journal (without figures and tables, with about 3 subheads and paragraphs) usually contains roughly 6200 characters. The number of figures plus tables should not exceed 9. Appendices will be published as Supporting Information rather than in the main text.

References: About 40 to 50 references usually fill one printed page.

Arrangement Research papers

Title page: The first page of each paper should indicate: The title, the author's names and affiliations, a short title for use as running head, the name, address, e-mail address, phone and fax number of the corresponding author, and 3 to 7 keywords. *Abbreviation:* List with abbreviations where appropriate. *Abstract:* Abstracts must not exceed 250 words. The following sections cover the usual contents: Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, References (see below), Tables (see below), Figure legends (see below), Illustrations (see below). In Materials and Methods, Results and Discussion subheadings are possible. If an author chooses to combine sections Results and Discussion, an additional section Conclusions can be added, but this must be brief.

Concise review articles

Choose subheadings as appropriate but do not use a numbering system. Title page, Key words, Abstract and other items as for full length papers.

Tables

Tables must be serially numbered in Arabic numerals and each must carry a brief descriptive heading. Tables reproduced from other publications must state their precise source. Only signs that can be typeset should be used in the tables and legends. Please provide Tables in Word and include them at the end of the manuscript after the References, each on a separate page. Refrain from using both tables and graphs to demonstrate the same results.

Figures and Graphics

Electronic artwork It is essential that all artwork is provided in electronic format. Please save vector graphics (e.g. line artwork) in Encapsulated Post-script (EPS) format and

bitmap files (e.g. half-tones) in Tagged Image Format (TIFF). Detailed information on our digital illustration standards is available at

<http://www.blackwellpublishing.com/bauthor/illustration.asp>. Please do not embed any tables and/or figures in the text document. If you should encounter difficulties upon submitting figures and graphics, please contact the editorial office by e-mail under annette.schlierenkamp@ctp.uni-freiburg.de or by telephone under ++ 49/(0)761/203-8300.

Colour illustrations: Authors are required to cover the cost of colour printing. Therefore, please note that if there is colour artwork in your manuscript when it is accepted for publication, Blackwell Publishing require you to complete and return a colour work agreement form before your paper can be published. Colour printing costs €300 per article + VAT. Please supply colour work as eps, tiff or jpg files. The colour work form can be downloaded as a PDF from the internet. [To download PDF files you must have Acrobat Reader installed on your computer. If you do not have this program, this is available as a free download from the following web address:

<http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. The web address for the form is http://www.blackwellpublishing.com/pdf/PLB_CWAF.pdf.

References

The list of references must include all (but no additional) references quoted. Arrange references alphabetically according to author name, not chronologically. The name of the journals containing the cited papers should be given in full. Each article reference should be given as in the following example: Alfano, J.R. and Collmer, A. (2004) Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defence. *Annual Review Phytopathology*. **42**, 385-414. Books or other non-serial publications which are quoted in the references must be cited as follows: Han, J. and Kamber, M. (2001) *Data Mining: Concepts and Techniques*, 1st edn. Morgan Kaufmann Publishers, San Francisco. Platt T., Sathyendranath S. (1995) Latitude as a primary factor in the calculation of primary production. In: H.R. Skoldahl, C. Hopkins, K.E. Erikstad & H.P. Leinaas (Eds). *Ecology of Fjords and Coastal Waters*. Elsevier, Amsterdam: 3-25. Articles not yet published may only be cited if they have definitely been accepted for publication. They must be denoted by the expression 'in press'. We recommend the use of a tool such as EndNote or Reference Manager for reference management and formatting.

Units

Plant Biology will follow the system of SI units (Système International d'Unités). Within a given paper chosen units must be uniform.

Abbreviation

Note that common abbreviations can be used without explanation. Others must be explained. In case of doubt always give an explanation. Use FW = fresh weight and DW = dry weight.

Scientific Names

Scientific names should be cited in their complete form when first mentioned with genus - species - authority - cultivar (cv.) or subspecies (ssp.) where appropriate. Latin names should be underlined or typed in *italics*. Subsequently the generic names should be abbreviated, but avoid confusion: e.g. use *A. comosus* if the only genus with a first letter A in your paper is *Ananas*; but use unambiguous abbreviations if you have more than one genus with the same first letter, e.g. *Ananas comosus*, *Aechmea nudicaulis* = *A. comosus*, *Ae. nudicaulis*, etc. Common names of organisms must be accompanied by the correct scientific name when first mentioned. For rare or exotic genera it may be useful to give the name of the family and/or higher taxon in brackets when first mentioned.

9.2 Normas para publicação no periódico Oikos

Manuscripts should be submitted as one single pdf-file with tables and figures included. Upon acceptance the manuscript should be provided in Microsoft Word, Rich Text Format or Post Script format with high resolution figures included. *Oikos* does not yet accept manuscripts in Microsoft Word 2007 format.

Language. Manuscripts should be in English. Linguistic usage should be correct. Avoid the use of the passive voice. Avoid extensive reviews in the Introduction and Discussion. Cite only essential sources of a theory or opinion.

Title. The title should be brief and contain words useful for indexing and information retrieval.

Text. The first page should contain only the title and the author's name, address, fax and email-address. Page two contains the abstract, in which the main results of the work should be summarized. The abstract should not contain more than **300** words. Begin the introduction on page three. Avoid right margin justification and hyphenation. Double-

check the contents of your manuscript before submitting. Only printer' mistakes in proofs will be changed free of charge. Oikos do not print symbols or formulas in italics.

Illustrations. Tables and legends of illustrations should be written double-spaced on separate sheets. Do not incorporate the legend in the figure itself. Tables and illustrations should be comprehensible without reference to the text. Do not use italic lettering. Figures should be planned to appear with a maximum final width of 8 cm (single-column), 12.5 cm (1.5 column) or 16.6 cm (double-column). The font used in figures should be either Helvetica or Arial. Letters, numbers and symbols must appear clearly but not oversized. A suitable final size for lettering is 1-2 mm at reproduction size. One uniform size throughout is generally recommended. Avoid complicated symbols or patterns. Use open and closed circles, squares and triangles; open, striped and closed bars in histograms. Each figure should be boxed in and scale marks (turning inwards) provided. Lines should be clear, but not thick and heavy. Plan your illustrations for the smallest size possible (one column). Be sure that the lettering is clear and readable, even if the figure is de-sized. Colour plates may be included at the author's expense.

Units. Use SI units as far as possible.

Nomenclature. Binomial Latin names should be used in accordance with International Rules of Nomenclature.

References. In the list of references (double-spaced), the following usage should be conformed to: **Journal** Haila, Y. and Järvinen, O. 1983. Land bird communities on a Finnish island: species impoverishment and abundance patterns. - *Oikos* 41: 255-273. If more than two authors: Lindsay, A. et al. 2000. Are plant populations seed-limited? A review of seed sowing experiments. - *Oikos* 88: 225-238.

Book Mayr, E. 1963. *Animal species and evolution*. - Harvard Univ. Press. Chapter Goodall, D. W. 1972. Building and testing ecosystem models. - In: Jeffers, J. N. R. (ed.), *Mathematical models in ecology*. Blackwell, pp. 173-194. In the text references are given: Mayr (1963) or, at the end of a sentence, (Mayr 1963). Titles of journals should be abbreviated following *Biological Abstracts*. If in doubt, give the title in full. Do not refer to unpublished material. The list of references should be arranged alphabetically on authors' names and chronologically per author. If the author's name is also mentioned with co-authors the following order should be used: publications of the single author, arranged chronologically - publications of the same author with one co-author, arranged chronologically - publications of the author with more than one co-author, arranged chronologically. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 2004a, 2004b, etc. Reference lists not conforming to this format will be returned for revision. Excessive use of references causes unnecessary long articles. To avoid excessive use of references, use only the most relevant. As a rule, avoid using more than 50 references in a regular research paper. Acknowledgements. Keep them short. Appendices. Long appendices may be posted on the journals homepage.

Authors are recommended to follow the guidelines set out in: O'Connor, M. 1991. *Writing successfully in science*. - Harper Collins Academic, London, **and to examine the latest issues of *Oikos***. Manuscripts not conforming to the requirements will be returned for revision.

9.3 Normas para publicação no periódico *American Journal of Botany*

Submission process

Submit your manuscript via the online submission and review system, Editorial Manager, at <http://ajb.edmgr.com>. First-time users need to register for an account at this URL using their active e-mail addresses. The same Username and Password created on Editorial Manager are used to log in as an author or as a reviewer. [If there are any difficulties in the login or submission process, contact the Editorial Office at ajb@botany.org for assistance.]

There is a mandatory charge for more than five changes made on proofs resulting from mistakes made by the author(s). Author(s) who require a figure replacement in the e-galleys stage, unless the error was caused by the *AJB* editorial staff or the compositor, will be charged \$25 for each figure replacement or correction.

Authors are encouraged to submit figures in color when doing so enhances the presentation of the scientific information. Due to the cost of printing color, however, the editor may recommend using black and white if the information is just as clear when presented this way..

Article Types

In addition to Research Papers, *AJB* publishes the following:

Special Invited Papers—These are mostly reviews of limited scope on timely subjects written for a general, albeit well-informed, audience. Special Invited Papers are typically solicited by the Editor-in-Chief, the Special Papers Editor, or an Associate Editor. Discuss ideas for unsolicited Special Papers with the Editor-in-Chief or the Special Papers Editor. Manuscripts are subject to the usual review process. Benefits for Special Invited Papers include rapid publication, no page charges, and free membership in the BSA for one year. In the introduction, succinctly explain why your paper is of interest to the general biological community.

Brief Communications—These are short papers (2–5 printed pages) reporting significant new findings that do not warrant standard full-length treatment with the usual main headings, or that provide scholarly commentaries, corrections, criticisms, or alternative interpretations of results presented in published papers. “Opinion” papers that are unsupported by new data or reanalysis of published data are unacceptable. Brief Communications are subject to normal review. Publication will be expedited. Membership requirements and page charges are not waived.

Invited Commentary—All invited commentaries are paired with a forthcoming paper, usually on the suggestion of an Associate Editor or the Editor-in-Chief. These 3- to 5-page articles discuss the contributions and significance of the research paper relative to accepted or emerging paradigms in the subject. Membership requirements and page charges are waived.

Manuscript Preparation

A cover letter, an author agreement form, a manuscript file, and separate files for figures should be uploaded at <http://ajb.edmgr.com>. The manuscript file includes in the following order: Title Page, Footnote Page, Abstract Page, Text, Literature Cited, Tables, Appendices, and Figure Legends.

For manuscript files, MS Word (.doc) format is preferred, but Rich Text Format (.rtf) files are acceptable for review as well.

The Editorial Manager online submission system automatically inserts line numbers to facilitate review comments, so line numbers are not required in the manuscript file.

Double-space and left justify the margin of the entire manuscript, including Literature Cited, Appendices, Figure Legends, and Tables, using continuous pagination.

Leave at least a 2.5-cm margin on all sides. Place a header with last name(s) of author(s) and page number in upper right corner.

Number figures and tables in the order discussed in the text.

Cover/Response Letter

Include a cover letter that describes the questions addressed or hypotheses tested, the major contribution of your paper to your discipline, and how this contribution is of interest to a broad audience. List any papers on related topics by any of the authors that have been published within the past year or that are in review or in press. For a revision, include a letter detailing your response to all the review comments.

Author Agreement Form

Upon initial submission of a manuscript, the corresponding author must fill out an author agreement form and either upload an electronic version at the online submission site or mail or fax a hard copy to the Editorial Office in St. Louis, Missouri (**American Journal of Botany**, P.O. Box 299, St. Louis, MO 63166-0299, USA; 1-314-577-9515).

The author agreement form is available online at http://www.botany.org/ajb/AJB_Author_Agreement_Form_2.docx; on the Editorial Manager website at the “Attach Files” screen; and from the Editorial Office.

Manuscript Content

1. Title Page

Place a running head 2.5 cm (1 in) below the top of the page with the surname of the FIRST author (followed, as appropriate, with the surname of a sole co-author, or with et al. if there are three or more authors) and a short title. The manuscript title for research papers should be specific and informative, conveying

the key findings of the research in an active voice. Center boldfaced title written with sentence-style capitalization, followed by superscript 1 (for footnote 1, to appear on footnote page). In most cases, Latin binomials in a title should be followed by the name of the family in parentheses.

Below the title, list authors: each author's first name, middle initial, surname. On the next line, give affiliation and unabbreviated address. If authors have different affiliations and addresses, add a superscript number after each author's name to indicate the footnoted address. Include another footnote superscript number to indicate the author for correspondence.

2. Footnote Page

Include _____ the _____ following _____ footnote:

¹Manuscript received _____; revision accepted _____.

Place brief acknowledgments, if desired, as a separate paragraph, using the following style: "The author(s) thank(s)...". For brevity, do not use first names. Include grant acknowledgments here.

Other footnotes (e.g., e-mail for correspondence) are permitted: match footnote numbers with those on the title page.

3. Abstract Page

AJB requires structured abstracts for manuscript submission. The abstract is 250 words or less, written in the following structured format:

- *Premise of the study* (why the work was done, what major questions of plant biology are addressed, and why it is important to the broad *AJB* readership)
- *Methods*
- *Key results*
- *Conclusions* (what major points should the reader take from this article)

Note that the abstract will be used in an RSS feed and thus should capture the interest of the general botanical community as well as the specialists and include the most important contribution of this paper. Avoid references; if essential, cite parenthetically with journal name, volume number, pages, and year.

Provide a list of 3–10 "**Key words**" that will be used for the volume index. Capitalize proper nouns, place in alphabetical order, and separate by semicolons.

4. Text

In the first paragraph of the introduction, include the theoretical or conceptual basis for your work in a context accessible to the diverse botanical readership that *AJB* attracts. Include a summary of conclusions and a take-home message for the generally informed reader in the DISCUSSION.

Center main headings and capitalize all letters: MATERIALS AND METHODS, RESULTS, and DISCUSSION.

Indent subheadings at the start of a paragraph; capitalize only the first word and proper nouns and adjectives.

Second-level headings—(boldface italic followed by an em dash)

Third-level headings—(italic followed by an em dash) Fourth-level headings—(regular text followed by an em dash)

In MATERIALS AND METHODS add name, city, spelled-out state (if in USA), and country of manufacturers/suppliers after brand names.

If statistical analyses are used, include statistical values in the RESULTS either in the text or within tables. Include the statistic value, degrees of freedom, and *p*-value for each result reported (e.g., for a *t*-test report “*t* = 32.41, *df* = 1, *P* = 0.03“ for an ANOVA report “*F*_{5, 23} = 26.45, *P* less than 0.001” [note two *df*-values as subscripts with *F*]). Use *P* for significance, and *p* for probability.

Common Latin words (e.g., *in vivo*, *sensu lato*) are not italicized.

Footnotes are not used in the text.

5. Literature Cited

Verify all entries against original sources. Double check that all references in the manuscript text are in the Literature Cited and vice-versa and that they agree in spelling and year.

Literature citations in text—Cite references in chronological order (oldest first); within a given year, order them alphabetically (e.g., Jones and Gil, 1999, 2006; Ashton et al., 2007; Brown, 2007; Jackson, 2005, 2008).

Single author: Jones (2008) or (Jones, 2008). Two authors: Jones and Gil (2008) or (Jones and Gil, 2008). More than two authors: Jones et al. (2008) or (Jones et al., 2008).

Manuscripts accepted for publication but not yet published: Jones (in press) or (Jones, in press). Include “In press” citations in LITERATURE CITED (shown later).

Unpublished data and manuscripts (e.g., submitted, in prep.) and personal communication: (F. Jones, Institution, unpublished data [or unpublished manuscript or personal observation]). These are not included in LITERATURE CITED.

References listed in LITERATURE CITED—List citations in alphabetical order by author. Single-author titles precede multi-authored titles by the same senior author, regardless of date.

List works by the same author(s) chronologically, beginning with earliest date of publication. Spell out all author(s) names. Use “a”, “b” (determined alphabetically) for works with the same author(s) and year citation.

For multi-authored works, list the first seven authors and then “et al.”— unless there are only eight authors and then list all eight.

Technical report

CONKLE, M. T., P. D. HODGSKISS, and S. C. HUNTER. 1982. Starch gel electrophoresis of conifer seeds: A laboratory manual. USDA Forest Service General Technical Report PSW-64, Pacific Southwest Forest and Range Experiment Station, Berkeley, California, USA.

6. Tables – include in manuscript file and place immediately after Literature Cited

Tables need to be formatted using the Table feature in Word or in a spreadsheet such as Excel.

Number tables with Arabic numerals followed by a period. Capitalize first word of title; all others, except proper nouns, are lowercase; spell out names of genera and abbreviations on first mention; place period at end. Include study organism (species or group) and geographic location in each caption when appropriate. Place explanatory notes and define all abbreviations below the table after the heading “Note:” or “Notes:”. Place footnotes after the Notes.

Every column must have an appropriately placed heading (esp. the first at left—the stub head), with appropriate subheadings. In the body of the table, capitalize the first word of each entry (and proper nouns); do not use vertical lines between columns; indicate footnotes by lowercase superscript letters.

If the use of color in a table is essential, please contact the Editorial Office at ajb@botany.org.

7. Appendices – include in manuscript file and place immediately after the tables

If voucher and gene accession information support the study, list these in Appendix 1,

which will be published in the print and online versions. Provide an appendix title, and a sentence-style row of headings for the data. For each taxon sampled, include specimen voucher information and/or gene accession numbers, separated by commas. To save space, the taxa can be run together in a paragraph. See a current issue or <http://www.amjbot.org/content/98/6/1049.full> for an example.

Additional appendices may be included. *AJB* encourages online-only publication of extensive appendices, as well as other supplemental materials that support the article but are best presented electronically (see “Online Supplemental Materials” below).

8. Figure Legends – include in manuscript file and place immediately after the Appendices (or after the tables if there are no appendices)

Each figure legend must be complete and informative so that reference to the text is not necessary to understand the content of the figure. Abbreviations should be defined unless they are standard convention. Place legends as separate paragraphs following the appendices. For figures with multiple lettered panels, a general title for the figure should be followed by a description of each panel (e.g., Fig. 5. Relationship between... (A) All fruits. (B) Fruits less than 0.5 mm.). When applicable, study organism (species or group) or geographic location, and define scale bar (e.g., Bar = 0.1 μm). For micrographs, include pertinent information such as magnification and type of section, stain, optics, or special techniques. Any nonlinear adjustment to photographs must be detailed.

Define all symbols and abbreviations either in a key within the figure or in the legend; if defined in an earlier legend, the appropriate figure or table may be cited.

Place figure abbreviations in alphabetical order and format as follows: c, cell; n, nucleus.

9. Figures/Illustrations - upload as separate files (do not include in the manuscript file)

For details and illustrated examples, see http://www.botany.org/ajb/AJB_Digital_Art_Guidelines.pdf. A figure checklist is also available at http://www.botany.org/ajb/AJB_Figure_Checklist.pdf.

TIFF or EPS formats are preferred for color and black and white photographs, drawings, and graphs.

Prepare figures at the final size desired: 1 column (8.9 cm [3.5 in]), 1.5 column (12.7-15.3 cm [5-6 in]), or 2 columns (18.4 cm [7.25 in]) wide and less than the length of the page (23 cm [9 in]).

Low-resolution files may be initially uploaded/submitted for the review process. Once your manuscript has been tentatively accepted, printer-quality (high-resolution) figures are required. See “Tips for Large Files” below.

Figure Manipulations

Certain types of electronic manipulations of micrographs and other digital images may not be ethically acceptable. Images that will be compared with each other must be acquired and processed under the same conditions. Manipulations such as background subtraction or white-balancing should be explained in the Materials and Methods section. Note that a selected area within an image may not be altered or enhanced; the entire image must be treated the same. Linear adjustments to contrast, brightness, or color must be applied to an entire image or plate equally (or explained). Detail nonlinear adjustments in the legend. Always keep original raw data files for documentation upon request.

Resolution for Final Figures

Line art (black lines and text, including phylogenetic trees): 1000-1200 dpi.

Halftone/grayscale (images with shades of gray, such as black and white photographs): a minimum of 300 dpi.

Color: a minimum of 300 dpi. Use RGB mode (not Indexed Color Mode). [Note: Do not send color files if images are to be printed in black and white.]

Combination art (grayscale image with type): 600-900 dpi.

Grayscale images should have the whitest area of the image set at a 2% highlight value, while the blackest area of the image should be set to a 98% shadow value.

Include the screen and printer font files for any text that has been added to the figure. Use PC or Mac versions of Adobe Postscript fonts. To avoid font problems, convert all type to curves or paths.

Format and Style

Use consistent style, font, and font size (between 6 and 10 pt.) for all figures. Use of standard fonts (Times New Roman, Helvetica) gives better results.

For figures with multiple elements (photos, drawings, or graphs), group elements in a rectangle or square and label the top left corner of each element with a capital letter

(e.g., A, B). Keep elements close together for best use of space. Photographs in a composite plate should each be numbered and separated by a thin line or blank space.

Label axes; include Standard International (SI) Units of measure in parentheses; capitalize only the first letter of the first word (e.g., “Stem growth (%)”). Axis label should be c. 0.2 cm from units on axis, but no more than 0.5 cm; x- and y-axis labels should be equidistant from axes. Use abbreviations consistently in the text and figures.

For magnified illustrations, provide a scale bar defined in either the figure itself or at the end of the legend.

Cover image and caption

You are invited to submit one or more color photographs (or artificially colorized photomicrographs) to be considered for a cover illustration. The image must be at least 300 ppi and in portrait format slightly larger than 21.6 cm wide × 28 cm high (8.5 x 11 in). Submit the file(s) online with your original submission or revised manuscript. Also include a brief caption that describes the image, scientific name and authority of any organism, photographic technique, image manipulation, and the major result of the research. For micrographs, include pertinent information such as magnification and type of section, stain, optics, or special techniques.

The legend should do more than just describe the image itself: it should "tell a story" by explaining why the image is important to entice the reader to search for the full article.

See <http://www.amjbot.org/content/vol95/issue4/cover.shtml> for an example.

Tips for Large Files

Files >5 MB may be slow (or impossible) to upload on most servers. When saving graphics, LZW compression (Save As/Option) may be used to reduce file size. If your image is line-art and all pixels are either black or white, first convert the image to grayscale mode, then convert to bitmap mode at 1200 dpi, then save with LZW compression. If your image is black and white with gray portions, convert the image to grayscale mode, then save with LZW compression. (If you have any confusion about bitmap mode for line-art, your Digital Art Guidelines contain examples of image types with suggested resolutions. Alternatively, the Editorial Office may direct you to upload the files to an FTP site or send them via e-mail through <http://www.YouSendIt.com>.

Online Supplemental Materials

Authors may wish to augment their manuscripts with online supplemental materials (e.g., large data sets, three-dimensional reconstructions, simulations, real-time movies,

color photographs). Upload these appendices as separate files with the initial manuscript submission. Include a header on each file using this format: Smith et al.—American Journal of Botany 99(#): ###-###. 2012. – Data Supplement S1 – Page 1”. Name online supplements Appendix S1, Appendix S2, etc, in the order in which they appear in the text, regardless of whether they are tables, figures, text, other media, or a combination thereof. In the manuscript, after the mention of an online appendix, include the following: “(see Supplemental Data with the online version of this article)”.

Note that if authors wish to submit long DNA sequence appendices as supplemental material, they should select the "DNA sequences (online-only supplemental)" option on Editorial Manager. This ensures that lengthy appendices are not built into the reviewers' PDF, but are still accessible to the reviewers.

Abbreviations, Units, and Symbols

See a recent Table of Contents page for commonly used abbreviations.

Do not begin a sentence, heading, or title with an abbreviation.

Abbreviate figure as “Fig.” or “Figs.”

Use the following abbreviations with numerals without spelling out at first use: h, min, s, yr, mo, wk, d, cm, mm, DNA, cpDNA, RNA, dNTP. Designate temperature as in 30°C (use the degree sign, not zero or the letter o).

Numbers: write out one through nine unless a measurement, a designator, or in a range (e.g., four petals, 3 mm, 6 yr, 5–11 species, day 2). Use % instead of percent with numerals; 1000 instead of 1,000; 10 000 instead of 10,000; 0.13 instead of .13.

Use Standard International (SI) units throughout the text, figures, and tables. Use the word mass (kg, g, mg) correctly; weight is reported in newtons (N). Use either a solidus for one unit in the denominator (e.g., kg/m²) or a negative exponent with multiplier dot (e.g., kg•m⁻²•d⁻¹) for two or more units in the denominator. Use L for liter (mL for milliliter).

Include a space before and after all operation signs (e.g., =, +) with equations and definitions; use an en dash (width of two hyphens) for minus sign.

Copyright and Color Agreement Forms

Once your manuscript has been accepted for publication, return signed copyright forms for the article, and any color plates, to the Editorial Office in St. Louis, Missouri. All authors must sign off on the copyright form or contact the Editorial Office to confirm their participation in the work.

Copyright Assignment - <http://www.botany.org/ajb/AJBcopyright.pdf>

Color agreement form - http://www.botany.org/ajb/AJBcolor_agr.pdf

If you have reproduced copyrighted material in your manuscript, send proof of permission to the Editorial Office.

If you would like to reproduce copyrighted material previously published in the *American Journal of Botany*, return the completed permission request form available online at <http://www.botany.org/ajb/BSAPermission.pdf>.

9.4 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 first page should 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 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“ and „SHORT COMMUNICATIONS“ 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. 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**. 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.

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. 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.

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.

Online references 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 . . .').

Funding. 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 full official funding agency name should be given, i.e. „National Institutes of Health“, not „NIH“; grant numbers should be given in brackets; multiple grant numbers should be separated by a comma; agencies should be separated by a semi-colon; no extra wording like 'Funding for this work was provided by ...' should be used; 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: „National Institutes of Health (CB5453961 to C.S., DB645473 to M.H.); Funding Agency (hfygr667789).“

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.

