

LAÍS ANGÉLICA DE ANDRADE PINHEIRO BORGES

**BIOLOGIA REPRODUTIVA DE ESPÉCIES LENHOSAS DE
LEGUMINOSAE NA CAATINGA**

RECIFE

2010

LAÍS ANGÉLICA DE ANDRADE PINHEIRO BORGES

**BIOLOGIA REPRODUTIVA DE ESPÉCIES LENHOSAS DE
LEGUMINOSAE NA CAATINGA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Biologia Vegetal.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Ariadna Valentina Lopes

Coorientadora: Prof^ª Dr^ª Isabel Cristina Machado

RECIFE

2010

Borges, Laís Angélica de Andrade Pinheiro
Biologia reprodutiva de espécies lenhosas de Leguminosae na Caatinga/ Laís Angélica de Andrade Pinheiro Borges– Recife: O Autor, 2010.

105 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Ariadna Valentina Lopes

Coorientadora: Isabel Cristina Machado

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Biologia Vegetal, 2012.

Inclui bibliografia e anexos

1. Leguminosae 2. Polinização 3. Caatinga I. Título.

583.74

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2012-067

LAÍS ANGÉLICA DE ANDRADE PINHEIRO BORGES

“BIOLOGIA REPRODUTIVA DE ÉSPÉCIES
LENHOSAS DE LEGUMINOSAE NA CAATINGA”.

BANCA EXAMINADORA:

Dra. Ariadna Valentina de Freitas e Lopes (Orientadora) – UFPE

Dra. Inara Roberta Leal – UFPE

Dra. Tarcila Correia de Lima Nadia – UFPE-CAV

Dr. Marcelo dos Santos Guerra Filho - UFPE

Dr. Paulo Eugênio Alves Macedo de Oliveira – UFU

Recife- PE
2010

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora querida, Ariadna Lopes (ori), mais uma vez obrigada por todos esses anos de orientação sem igual. Por você sempre acreditar, incentivar e ajudar com os meus sonhos, e, mais do que isso, pela amizade, carinho e confiança que demonstrou em todo o tempo, serei sempre grata. Espero que essa relação tão preciosa continue pela vida afora.

A Isabel Machado, minha co-orientadora, pela constante presença, disponibilidade em ajudar, pelas boas ideias e pelo carinho.

Ao CNPq, pela bolsa de doutorado, taxa de bancada e apoio financeiro concedido através de projeto de pesquisa coordenado por A. Lopes (Processo nº 567739/2008-2).

Ao Prof. Dr. Marcelo Guerra, por permitir a realização de parte do trabalho no Laboratório de Citogenética Vegetal e pela parceria enriquecedora no trabalho com *Libidibia ferrea*.

Ao Centro de Pesquisas Ambientais do Nordeste (CEPAN), através do Prof. Dr. Marcelo Tabarelli, por viabilizar o uso do carro (Toyota) em viagens a campo.

Ao Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), pela permissão para realização do estudo na Estação Experimental de Serra Talhada.

À Senhora Dodôri, Seu Antônio e Seu Edísio, pela permissão para realização do estudo em suas propriedades em Alagoinha e Poção.

Ao Sr. Gilcean, pelo valioso auxílio e pelos momentos alegres no trabalho de campo.

A Kelaine Demétrio, Sheila Milena Soares e Thamires Campos, pela grande ajuda no trabalho de campo; A Éville Karina Ribeiro, pela ajuda no trabalho de laboratório; e a Renata Pires Sola, pela ajuda com os frutos de *Libidibia ferrea*.

A George Machado e Mellissa Sobrinho, além de tantos outros companheiros ocasionais de viagem, pela agradável companhia e ajuda em viagens de campo a Serra Talhada, pelas valiosas discussões sobre biologia reprodutiva, além da inestimável amizade.

A todos que me ajudaram a confeccionar saquinhos para as polinizações: Alessandra, Felipe, Sr. Gilcean, Thamires, Walkiria, Celeste (mãe), Lúcia (tia)...

À MSc. Elisabeth Córdula (IFPE), pela identificação do material botânico e ao MSc. Carlos Eduardo Nobre, à Dr^a Débora Coelho (UFMG) e à Dr^a Gisele Azevedo (UFMA), pela identificação do material zoológico.

Ao MSc. Antônio Venceslau de Aguiar Neto (Patriota), pela aquisição de várias referências bibliográficas e pelas conversas enriquecedoras.

A Luiz Gustavo Souza, pela ajuda e parceria no trabalho de *Libidibia ferrea*.

À Prof. Dr^a Andrea Pedrosa e a Liliane Dantas, por me ensinarem e compartilharem os primeiros passos no uso de marcadores moleculares, apesar dos resultados não estarem aqui.

À Dr^a Tarcila Nadia, por toda a ajuda em diversas etapas dentro e fora do laboratório, além da afetuosa companhia e amizade.

Às minhas queridas co-orientandas Renata Pires e Thamires Campos, pela possibilidade de começar a exercitar a difícil tarefa de orientar - que possamos nos desculpar pelos erros mútuos e que nunca se esqueçam do carinho que sinto por vocês.

Ao mestre e amigo Marcos Meiado, pela inestimável amizade e inúmeras ajudas, parcerias e conversas enriquecedoras, sejam elas biológicas ou não.

Ao Prof. Dr. Martinho Carvalho, pela amizade, incentivo e esclarecimentos sobre a vida acadêmica.

Aos professores, funcionários e colegas do PPGBV e do CCB, pelo apoio e crescimento profissional e pessoal que proporcionaram.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Floral e Reprodutiva, pela convivência agradável e enriquecedora, pelos momentos de trabalho e também pelos de descontração. E também aos colegas do Laboratório de Citogenética, que me acolheram com carinho nos momentos que precisei.

A Felipe Lucena, pela grande ajuda em preparar saquinhos para as polinizações, transplantar mudas de amburana e cuidar de meus filhos felinos durante as viagens a campo.

Aos amigos, sem os quais, certamente, eu não teria tido condições emocionais de chegar até aqui: Caroline, Cíntia, Danise, Fernanda, Halana, Helen, Jacira, Leonardo, Luciana, Mellissa, Sandra - obrigada pelos bons momentos dentro e fora da vida acadêmica.

A Alessandra Bastos, Éville Karina Ribeiro e Sheila Milena Soares, pela grande amizade conquistada durante os anos, por entenderem quem eu sou e pela inestimável companhia.

À Rochele Castelo Branco, uma irmã, que, apesar da distância, está sempre presente em minha vida.

Finalmente, não poderia deixar de agradecer a meus pais, Luiz e Celeste, meus irmãos, Ângelo e Lucele e à minha avó, Inês, por me mostrar o significado e o valor da família. Além de todo o carinho e incentivo, vocês foram essenciais para a execução deste trabalho, seja através da viabilização do meu carro, com o qual foram feitas muitas viagens de campo, seja através da aquisição da máquina fotográfica e até me acompanhando em trabalho de campo. Obrigada por tudo!

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	iv
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
APRESENTAÇÃO	01
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	03
1. Biologia Reprodutiva de Leguminosae, com ênfase nas subfamílias Caesalpinioideae e Mimosoideae	03
2. A Caatinga	07
Referências Bibliográficas	09
CAPÍTULO UM:	
Biologia reprodutiva de <i>Anadenanthera colubrina</i> (Vell.) Brenan (Leguminosae) .	14
CAPÍTULO DOIS	
Isolamento reprodutivo entre citótipos diplóides e tetraplóides de <i>Libidibia</i> (<i>Caesalpinia</i>) <i>ferrea</i> (Leguminosae): implicações ecológicas e taxonômicas	37
CAPÍTULO TRÊS	
Biologia reprodutiva de <i>Senna macranthera</i> (Collad.) H.S. Irwin & Barneby (Leguminosae – Caesalpinioideae)	72
CONCLUSÕES	103
RESUMO	104
ABSTRACT	105

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO UM

- Fig. 1.** Polinizadores de *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Leguminosae-Mimosoideae) em Serra Talhada, Pernambuco, Brasil. (A) *Apis mellifera*; (B) *Trigona spinipes*; (C) *Hemiargus hanno*; (D) Vespidae sp 36

CAPÍTULO DOIS

- Fig. 1.** Metáfases em citótipos diploide (A) e tetraplóide (B) de *Libidibia ferrea* (Leguminosae - Caesalpinioideae). (Barra = 5 μ m) 69
- Fig. 2.** Flor de indivíduo diplóide (A) e tetraplóide (B) de *Libidibia ferrea* (Leguminosae - Caesalpinioideae) ocorrentes em Pernambuco, Brasil; *Xylocopa frontalis* (C) e *Xylocopa grisescens* (D) polinizando flores de indivíduo tetraplóide (Barra = 0,5 cm) 70
- Fig. 3.** Número médio de sementes intactas, predadas e abortadas por fruto em indivíduos diplóides e tetraplóides de *Libidibia ferrea* ocorrentes no Estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil..... 71

CAPÍTULO TRÊS

- Fig. 1.** Flor e visitantes florais de *Senna macranthera* var. *pubibunda* em Serra Talhada, Pernambuco, Brasil. (A) Vista frontal da flor, exibindo a heteranteria, a enantiofilia e a curvatura de uma das pétalas inferiores, responsável pelo ricochete e deposição do pólen na região dorsal das abelhas polinizadoras; (B) Resultado do teste com hidróxido de amônio, indicando o contraste entre as metades superior e inferior das anteras; (C) *Xylocopa grisescens*, polinizadora, coletando pólen (notar o dorso coberto de pólen - seta); (D) *Exomalopsis analis*, pilhadora, coletando pólen por vibração, sem contatar o estigma (observar as corbículas cheias de pólen); (E) *Trigona spinipes*, pilhadora, coletando pólen após perfurar as anteras com as mandíbulas 101
- Fig. 2.** Taxa acumulada de aborto de flores e frutos imaturos a partir de tratamentos de polinização manual controlada e sob condições naturais em *Senna macranthera* var. *pubibunda* ocorrente em Serra Talhada, Pernambuco, Brasil. AM: autopolinização manual; NAT: polinização sob condições naturais; PC: polinização cruzada manual 102

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO UM

- Tabela 1.** Formação de frutos após polinizações controladas e naturais em *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Leguminosae - Mimosoideae), no município de Serra Talhada, Pernambuco, Brasil 34
- Tabela 2.** Distribuição por categorias de tamanho dos frutos ainda imaturos oriundos de polinizações controladas e naturais após cinco semanas da realização dos tratamentos em *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Leguminosae - Mimosoideae), no município de Serra Talhada, Pernambuco, Brasil. Frutos pequenos: até 2 cm; Frutos médios: de 2 a 4 cm; Frutos grandes: acima de 4 cm 35

CAPÍTULO DOIS

- Tabela 1.** Morfometria floral (média \pm DP) de citótipos diplóides e tetraplóides de *Libidibia ferrea* (Leguminosae - Caesalpinioideae) ocorrentes em Pernambuco, Brasil. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa 66
- Tabela 2.** Visitantes florais de indivíduos diplóides e tetraplóides de *Libidibia ferrea* (Leguminosae - Caesalpinioideae) ocorrentes em Pernambuco, Brasil 67
- Tabela 3.** Resultados dos tratamentos de polinização controlada e natural e Índice de Autoincompatibilidade (modificado de Zapata & Arroyo, 1978) em indivíduos diplóides e tetraplóides de *Libidibia ferrea* (Leguminosae - Caesalpinioideae) ocorrentes em Pernambuco, Brasil 68

CAPÍTULO TRÊS

- Tabela 1.** Visitantes florais de *Senna macranthera* var. *pudivunda* (Leguminosae - Caesalpinioideae) em Serra Talhada, Pernambuco, Brasil, com respectivos comportamentos de visita 99
- Tabela 2.** Formação de frutos maduros após tratamentos de polinização manual controlada (autopolinização e polinização cruzada) e sob condições naturais em flores de *Senna macranthera* var. *pudivunda* ocorrente em Serra Talhada, Pernambuco, Brasil 100

APRESENTAÇÃO

O conhecimento sobre a biologia reprodutiva das espécies vegetais de uma comunidade é fundamental para a compreensão dos processos e relações ecológicas e evolutivos e da dinâmica da comunidade. Além disso, informações relativas a essa área do conhecimento são indispensáveis na elaboração de estratégias de conservação para espécies e ecossistemas.

O número de estudos sobre a biologia reprodutiva de plantas ainda precisa aumentar bastante até que se tenha uma parte considerável das espécies e formações vegetacionais bem compreendidos no que diz respeito ao tema. No Brasil, que apresenta grande área territorial englobando diversos ecossistemas, parte da deficiência de estudos pode ser atribuída à vastidão de nossa biodiversidade e à reduzida quantidade de grupos de pesquisa no assunto. No entanto, iniciativas de alguns grupos têm permitido avanços consideráveis nesse sentido e, hoje, é possível dizer que a Caatinga, um dos maiores e mais importantes ecossistemas brasileiros, passou a ser foco de diversos projetos de pesquisa de graduação e pós-graduação. É o caso desta tese de doutorado, que investigou a biologia reprodutiva de espécies da família Leguminosae no ecossistema.

O trabalho está dividido em duas partes: uma fundamentação teórica abordando alguns tópicos em biologia reprodutiva de Leguminosae e Caatinga, e tem como função prover uma base para o restante do trabalho, e outra parte constituída por três capítulos, cada um consistindo de um estudo de caso com uma espécie lenhosa típica e abundante nas áreas do ecossistema. Além de abordar detalhes da reprodução de cada espécie, os manuscritos trazem contribuições importantes para os campos da biologia reprodutiva e evolução das plantas.

O primeiro capítulo, sobre a Mimosoideae arbórea *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, popularmente conhecida como angico, comprova a sua dependência de vetores de

pólen, uma vez que é autoincompatível, e a relevância de sua floração, no auge da estação seca, para a comunidade de insetos.

O segundo e o terceiro capítulos tratam da reprodução de duas espécies de Caesalpinioideae: *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz e *Senna macranthera* (Collad.) H.S. Irwin & Barneby, respectivamente. *Libidibia ferrea*, recentemente segregada do gênero *Caesalpinia*, é uma espécie arbórea conhecida como jucá ou pau-ferro que apresenta grande variabilidade morfológica. Uma possível causa para esse fato pode ser a ocorrência de poliploidia na espécie, que apresenta tanto populações diplóides, como tetraplóides, além de algumas populações mistas. O manuscrito aborda detalhes morfológicos e ecológicos de sua reprodução, sempre comparando os dois citótipos, além de analisar sistema, sucesso e isolamento reprodutivos de e entre diplóides e tetraplóides. As implicações ecológicas, taxonômicas e para planos de conservação e reflorestamento são discutidas.

Por fim, o arbusto *Senna macranthera* (pau-de-besouro) é estudado quanto à biologia floral, à ecologia da polinização e sistema e sucesso reprodutivos. A espécie, autoincompatível e conseqüentemente dependente de polinizadores, é um fator-chave para a reprodução de várias espécies de abelhas, que utilizam o pólen de suas flores na alimentação das larvas. Em conjunto, esses três estudos trazem informações inéditas e importantes sobre a biologia reprodutiva de espécies da principal família de plantas da Caatinga.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1. Biologia Reprodutiva de Leguminosae, com ênfase nas subfamílias Caesalpinioideae e Mimosoideae

As Leguminosae constituem a terceira maior família de angiospermas, com 19.325 espécies distribuídas em 727 gêneros e três subfamílias: Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae (LEWIS *et al.*, 2005). São componentes principais da maioria dos tipos vegetacionais do mundo e apresentam enorme importância econômica (LEWIS *et al.*, 2005). O nome da família é uma questão polêmica: enquanto muitos especialistas utilizam o termo “Leguminosae”, outros propõem “Fabaceae”, sendo ambos aceitos pelo Código Internacional de Nomenclatura Botânica de 2006, o Código de Viena (ICBN, 2006). Essa questão foi discutida no tratado mais recente sobre a taxonomia da família (“Legumes of the World”, LEWIS *et al.*, 2005). Para evitar ambiguidades, uma vez que o termo Fabaceae pode ser utilizado tanto para denominar a família como um todo, como para se referir apenas à subfamília Papilionoideae, que já foi anteriormente elevada à categoria de família (Papilionaceae), os autores optaram pelo uso do termo Leguminosae (LEWIS *et al.*, 2005). Esta também é a posição adotada no presente trabalho.

Parte do sucesso evolutivo da família é atribuída à grande elaboração de suas construções florais e mecanismos reprodutivos (ENDRESS, 1994). Sendo um grupo tão numeroso, diversificado e com muitas espécies economicamente importantes, falar sobre a biologia reprodutiva de Leguminosae é uma tarefa praticamente inesgotável. Desde a revisão feita por Arroyo (1981), há quase trinta anos, e com os avanços em diversas áreas da biologia, é de se esperar que o conhecimento sobre a reprodução de suas espécies tenha se ampliado bastante, especialmente em se tratando das espécies tropicais, que começaram a ser estudadas

de forma mais intensa nesse período. No entanto, mesmo com todo esse avanço, alguns padrões reconhecidos desde o trabalho pioneiro de Arroyo (1981) permanecem válidos e serão abordados a seguir, com as devidas atualizações, quando pertinentes.

Com relação ao sistema sexual, há o predomínio do hermafroditismo, sendo a dioícia pouco comum na família, com a maioria dos casos verificada em Caesalpinioideae; andromonoícia foi verificada para algumas Caesalpinioideae, poucas Papilionoideae e aproximadamente metade das Mimosoideae (ARROYO, 1981). Autoincompatibilidade foi registrada em espécies das três subfamílias, embora em proporções diferentes: uma vez que há forte correlação entre autoincompatibilidade e hábito lenhoso (STEBINS, 1957), esse sistema reprodutivo é mais comum em Caesalpinioideae e Mimosoideae, cuja maioria das espécies é lenhosa, do que em Papilionoideae, onde há riqueza de espécies herbáceas (ARROYO, 1981; ENDRESS, 1994). A ocorrência de apomixia foi observada nos gêneros *Senna* (Caesalpinioideae) e *Acacia* (Mimosoideae) (cf. KEARNEY, 2003).

A família é principalmente melitófila e, devido ao seu grande número de espécies e representatividade nos mais variados ecossistemas, constitui uma importante fonte de alimento para as abelhas (ARROYO, 1981). Em geral, as leguminosas melitófilas podem ser classificadas como generalistas, sendo incomum a dependência de um número limitado de abelhas (ARROYO, 1981). As flores nos membros das subfamílias Caesalpinioideae e Mimosoideae, geralmente abertas e sem necessidade de manipulação especial, são relativamente menos dependentes de abelhas do que as Papilionoideae, nas quais os mecanismos florais mais especializados tendem a excluir qualquer visitante que não as abelhas (ARROYO, 1981). Assim, interações com um amplo espectro de tipos de insetos são mais comuns naquelas duas subfamílias (ARROYO, 1981).

No entanto, como é de se esperar para um grupo tão rico e que ocupa quase todas as faixas de habitats das plantas terrestres (LEWIS *et al.*, 2005), a diversificação das estruturas

florais e a adaptação a todos os tipos de polinizadores podem ser encontradas nas Leguminosae. A família apresenta grande irradiação adaptativa de síndromes florais (*sensu* VOGEL, 1990), constituindo um grupo bastante expressivo para alguns sistemas de polinização menos frequentes do que a melitofilia, ocorrendo espécies polinizadas por aves, morcegos, borboletas e esfingídeos nas três subfamílias (ARROYO, 1981; VOGEL, 1990; ENDRESS, 1994; veja também KOPTUR, 1983; VOGEL *et al.*, 2005; BORGES *et al.*, 2009).

Apesar das três subfamílias apresentarem muitas características da estrutura floral em comum, há uma grande diversidade de formas florais (ENDRESS, 1994). Além disso, cada subfamília evoluiu um conjunto de tendências compartilhadas por um grande número de espécies, como será visto em mais detalhes a seguir para Caesalpinioideae e Mimosoideae, que englobam as espécies abordadas neste trabalho.

1.1 – Subfamília Caesalpinioideae

Há dez anos, Lewis *et al.* (2000) realizaram uma revisão sobre a biologia reprodutiva da subfamília Caesalpinioideae, reconhecendo que, dentre as Leguminosae, este é o grupo que apresenta a maior diversidade de arranjos florais. Os autores reconheceram que diversas formas florais e modos de reprodução podem ter surgido repetidas vezes dentro da subfamília. Infelizmente, a parafilia do grupo e a escassez de filogenias para vários de seus subgrupos ainda não permitem a determinação das direções dessas mudanças (LEWIS *et al.*, 2005).

As Caesalpinioideae possuem a maioria dos membros dióicos da família e certo número de espécies andromonóicas, conforme referido anteriormente (ARROYO, 1981; LEWIS *et al.*, 2005). Embora poucas espécies tenham sido testadas com relação ao sistema reprodutivo, observa-se o predomínio de espécies autoincompatíveis. A unidade de atração

pode ser a flor individual, inflorescências inteiras ou partes delas (ENDRESS, 1994). As flores vão de fraca a altamente zigomorfas, com ocorrência expressiva de assimetria floral, observada especialmente nos gêneros *Senna* e *Chamaecrista* (ARROYO, 1981; ENDRESS, 1994). Dentro desse contexto, outras características importantes encontradas em larga escala na subtribo Cassiinae são a enantioestilia e a heteranteria (MARAZZI *et al.*, 2007; MARAZZI; ENDRESS, 2008), estreitamente relacionadas com a polinização por vibração (“buzz-pollination”, BUCHMANN, 1983). Do mesmo modo que para a família, as espécies da subfamília são predominantemente melitófilas (ARROYO, 1981).

1.2 – Subfamília Mimosoideae

Se poucas espécies de Caesalpinioideae foram estudadas com relação à biologia reprodutiva, as Mimosoideae não apresentam um quadro melhor. Com exceção de alguns gêneros, como *Acacia* e *Inga*, com várias espécies estudadas (há inclusive uma revisão sobre a biologia reprodutiva no gênero *Acacia*, ver KENRICK, 2003 e STONE *et al.*, 2003), uma pequena fração da subfamília foi cuidadosamente analisada.

As Mimosoideae constituem o grupo de Leguminosae mais conservado com relação à forma floral (QUEIROZ, 2009). Flores pequenas, actinomorfas e densamente agregadas em inflorescências, que passam a constituir a unidade de polinização, são a regra (ARROYO, 1981). Outra característica marcante no grupo é a ampla ocorrência de flores estaminadas e hermafroditas num mesmo indivíduo (andromonoiccia) e a liberação de grãos de pólen de forma agrupada através de tétrades ou massas com maior número de grãos, denominadas políades (ARROYO, 1981; ENDRESS, 1994; QUEIROZ, 2009). Também aqui há o predomínio de espécies autoincompatíveis (ARROYO, 1981). A subfamília é basicamente melitófila, mas outros vetores de pólen são frequentes em alguns gêneros, como em *Inga*, por

exemplo, que apresenta várias espécies polinizadas por morcegos ou esfingídeos (e.g. KOPTUR, 1983; CRUZ-NETO; LOPES; MACHADO, 2007) e *Mimosa*, onde já foram registradas espécies ornitófilas e quiropterófilas (ver VOGEL; LOPES; MACHADO, 2005).

É interessante observar que vários aspectos da biologia reprodutiva foram importantes para a compreensão da evolução e das relações filogenéticas na subfamília Mimosoideae. Muitas tendências evolutivas no grupo foram baseadas em caracteres reprodutivos, como expressão sexual, polinização, palinologia, dentre outros (ver ELIAS, 1981), mas muito ainda se tem para estudar e parte do fato da subfamília ser mais negligenciada decorre não só da riqueza de espécies, mas também por suas flores serem diminutas e dificultarem experimentos detalhados.

2. A Caatinga

Apesar de apresentar distribuição cosmopolita, a maior diversidade de Leguminosae encontra-se nos trópicos (ENDRESS, 1994), sendo a família particularmente importante em áreas tropicais sazonais (PROCTOR; YEO; LACK, 1996). No Brasil, um importante exemplo desse tipo de ambiente é a Caatinga, uma formação vegetacional decídua e xerófila inserida no domínio do semiárido brasileiro, sendo Leguminosae a família mais rica em espécies do ecossistema (QUEIROZ, 2009).

Para Ferri (1980) e Rizzini (1997), caatinga é um termo genérico para designar um complexo de vegetação decidual e xerófila, constituída por vegetais lenhosos, com uma composição florística não uniforme e rica em cactáceas e bromeliáceas rígidas. A vegetação da Caatinga é própria e peculiar e os diferentes tipos vegetacionais são determinados, principalmente, pelo binômio clima-solo (ANDRADE-LIMA, 1981). Os domínios geomorfológicos da Caatinga correspondem (1) aos terrenos da porção cristalina, com solos

rasos, argilosos e rochosos, e (2) aos terrenos da bacia sedimentar, com solos profundos e arenosos (SAMPAIO, 1995). O clima dessa região é de caráter semi-árido quente, com temperaturas altas (24 a 29° C), precipitações escassas (entre 250 e 1000 mm/ano) e irregulares, podendo apresentar até 10 meses de seca (ANDRADE-LIMA, 1981). Tais variações climáticas e edáficas, associadas ao relevo, fazem com que a Caatinga englobe um número elevado de formações e tipos vegetacionais (FERRI, 1980; ANDRADE-LIMA, 1981).

A Caatinga é a única grande região natural brasileira cujos limites estão inteiramente restritos ao território nacional (LEAL *et al.*, 2003), ocupando cerca de 800.000 km² do Nordeste brasileiro e 11% do território nacional (RIZZINI, 1997). Apesar disso, é o domínio fitogeográfico menos estudado do país e um dos menos conhecidos da América do Sul, sofrendo ainda um processo antigo e contínuo de alteração ambiental, o que vem ocasionando a perda de biodiversidade no ecossistema (LEAL *et al.*, 2003). Sendo uma região pouco estudada, sua diversidade biológica tem sido freqüentemente subestimada (LEAL *et al.*, 2003). Esforços recentes, no entanto, têm evidenciado o valor biológico da Caatinga, sendo reconhecidos como endêmicos cerca de 18 gêneros e 318 espécies vegetais (GIULIETTI *et al.*, 2002).

Recentemente, a Caatinga vem sendo mais estudada em relação à biologia reprodutiva de suas plantas (e.g. MACHADO; LOPES, 2004; MACHADO; LOPES; SAZIMA, 2006, LEITE; MACHADO, 2010) e, de maneira geral, os trabalhos apontam para a semelhança entre a Caatinga e outros ecossistemas florestais tropicais. De acordo com Machado e Lopes (2004), apesar das restrições climáticas, a Caatinga apresenta sistemas de polinização diversificados e com poucas flores generalistas. Há predomínio de autoincompatibilidade (MACHADO; LOPES; SAZIMA, 2006; LEITE; MACHADO, 2010), o que implica que muitas espécies dependem de vetores de pólen para se reproduzir. Uma vez que as condições

climáticas mais severas desse ambiente parecem, a princípio, restringir a biodiversidade e a riqueza das interações entre as espécies, esses resultados são fundamentais para demonstrar a importância ecológica da Caatinga.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE-LIMA, D. The Caatingas Dominion. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 4, p. 149-153, 1981.

ARROYO, M. T. K. Breeding systems and pollination biology in Leguminosae. In: POLHILL, R. M.; RAVEN, P. H. (Ed.). **Advances in Legume Systematics**, Part 2. Kew: Royal Botanic Gardens, 1981. p. 723–769.

BORGES, L. A.; SOBRINHO, M. S.; LOPES, A. V. Phenology, pollination, and breeding system of the threatened tree *Caesalpinia echinata* Lam. (Fabaceae), and a review of studies on the reproductive biology in the genus. **Flora** V. 204, P. 111-130, 2009.

BUCHMANN, S. L. Buzz Pollination in Angiosperms. In: JONES, C. E.; LITTLE, J. R. (Ed.). **Handbook of experimental pollination biology**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1983. p. 73-113.

CRUZ-NETO, O.; LOPES, A. V.; MACHADO, I. C. Ecologia da Polinização de *Inga striata* (Benth.) (Leguminosae-Mimosoideae) em um remanescente de Mata Atlântica no Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 570-572, 2007.

ELIAS, T. S. Mimosoideae. In: POLHILL, R. M.; RAVEN, P. H. (Ed.). **Advances in Legume Systematics**, Part 1. Kew: Royal Botanic Gardens, 1981. p. 155-168.

ENDRESS, P. K. **Diversity and Evolutionary Biology of Tropical Flowers**. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1994. 511 p. Cambridge Tropical Biology Series.

FERRI, M. G. **Vegetação Brasileira**. São Paulo: Edusp, 1980..

GIULIETTI, A. M.; HARLEY, R. M.; QUEIROZ, L. P.; BARBOSA, M. R. V.; BOCAGNETA, A. L. & FIGUEIREDO, M. A. Plantas endêmicas da Caatinga. In: SAMPAIO, E. V. S. B., GIULIETTI, A. M., VIRGÍNIO, J. & GAMARRA-ROJAS, C. F. L. (Org.). **Vegetação e Flora das Caatingas**. Recife: APNE/CNIP, 2002. p. 103-115.

ICBN – International Code of Botanical Nomenclature (Vienna Code). 2006. Disponível em: <http://ibot.sav.sk/icbn/main.htm>.

KEARNEY, M. R. Why is sex so unpopular in the Australian desert? **Trends in Ecology and Evolution**, v. 18, p. 605-607, 2003.

KENRICK, J. Review of pollen-pistil interactions and their relevance to the reproductive biology of Acacia. **Australian Systematic Botany**, v. 16, p. 119-130, 2003.

KOPTUR, S. Flowering Phenology and Floral Biology of *Inga* (Fabaceae: Mimosoideae). **Systematic Botany**, v. 8, p. 354-368, 1983.

LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. Ecologia e Conservação da Caatinga: Uma Introdução ao Desafio. In: Recife: LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. (Ed.). **Ecologia e Conservação da Caatinga**. Recife: Editora Universitária da UFPE, 2003. 804 p.

LEITE, A. V. L.; MACHADO, I. C. Reproductive biology of woody species in Caatinga, a dry forest of Northeastern Brazil. **Journal of Arid Environments**, *in press*, 2010.

LEWIS, G. P.; SIMPSON, B. B.; NEFF, J. L. Progress in understanding the reproductive biology of the Caesalpinioideae (Leguminosae). In: HERENDEEN, P. S.; BRUNEAU, A. (Ed.). **Advances in Legume Systematics**, vol.9. Kew: Royal Botanic Gardens, 2000. p. 65-78.

LEWIS, G. P.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. **Legumes of the world**. Kew: Royal Botanic Gardens, 2005. 577 p.

MACHADO, I. C.; LOPES, A. V. Floral Traits and Pollination Systems in the Caatinga, a Brazilian Tropical Dry Forest. **Annals of Botany**, v. 94, p. 365-376, 2004.

MACHADO, I. C.; LOPES, A. V.; SAZIMA, M. Plant Sexual Systems and a Review of the Breeding System Studies in the Caatinga, a Brazilian Tropical Dry Forest. **Annals of Botany**, v. 97, p. 277-287, 2006.

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

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

PROCTOR, M.; YEO, P.; LACK, A. **The Natural History of Pollination**. Londres: HarperCollins, 1996. 479 p.

QUEIROZ, L. P. **Leguminosas da Caatinga**. Feira de Santana: Editora da UEFS, 2009. 443 p.

RIZZINI, C. T. **Tratado de Fitogeografia do Brasil: Aspectos ecológicos, sociológicos e florísticos**. 2ª Ed. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural Edições, 1997. 747 p.

SAMPAIO, E. V. S. B. Overview of the Brazilian caatinga. In: BULLOCK, S. H.; MOONEY, H. A.; MEDINA, E. (Ed.), **Seasonally dry tropical forests**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995. p: 35-63.

STEBINS, G. L. Self Fertilization and Plant Variability in the Higher Plants. **The American Naturalist**, v. 91, p. 337-354, 1957.

STONE, G. N.; RAINE, N.E.; PRESCOTT, M.; WILLMER, P.G. Pollination Ecology of Acacias (Fabaceae, Mimosoideae). **Australian Systematic Botany**, v. 16, p. 103-118, 2003.

VOGEL, S. Radiacion adaptativa del síndrome floral en las familias neotropicales. **Boletín de la Academia Nacional de Ciencias**, Córdoba, v. 59, p. 5-30, 1990.

VOGEL, S.; LOPES, A. V.; MACHADO, I. C. Bat pollination in the NE Brazilian endemic *Mimosa lewisii*: an unusual case and first report for the genus. **Taxon**, v. 54, p. 693-700, 2005.

CAPÍTULO UM

BIOLOGIA REPRODUTIVA DE *ANADENANTHERA COLUBRINA* (VELL.) BRENNAN (LEGUMINOSAE)

MANUSCRITO A SER ENVIADO AO PERIÓDICO

FLORA

Biologia reprodutiva de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan (Leguminosae)

Laís Angélica Borges^a, Isabel Cristina Machado^b, Ariadna Valentina Lopes^{b*}

^a Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Departamento de Botânica, CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Prof. Nelson Chaves, s/nº, Cidade Universitária, 50372-970, Recife, PE, Brasil

^b Departamento de Botânica, CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Prof. Nelson Chaves, s/nº, Cidade Universitária, 50372-970, Recife, PE, Brasil

* Autor para correspondência. *E-mail*: avflopes@ufpe.br, ariadna.lopes@pq.cnpq.br

Resumo

Anadenanthera colubrina var. *cebil* (Griseb.) Altschul é uma Leguminosae arbórea amplamente distribuída nas florestas tropicais sazonais secas da América do Sul. O objetivo deste trabalho foi investigar diversos aspectos da biologia reprodutiva da espécie, incluindo o sistema sexual, a biologia floral, a ecologia da polinização e o sistema reprodutivo. O estudo foi realizado em 2007 e 2009 no município de Serra Talhada, PE, Nordeste do Brasil. A espécie floresceu na estação seca e as inflorescências do tipo glomérulo são heteromórficas, com flores masculinas na base e hermafroditas no ápice, caracterizando andromonoiccia. A antese é diurna e algumas flores por inflorescência apresentam néctar. Os principais polinizadores foram abelhas (a introduzida *Apis mellifera* e a autóctone *Trigona spinipes*), mas também foram registradas espécies de vespas (*Polybia occidentalis* e Vespidae sp.) e uma de borboleta (*Hemiargus hanno*). O número médio de óvulos por flor foi 16 e cada políade possui 16 grãos de pólen. O Índice de Autoincompatibilidade foi de 0,1 e houve baixa formação natural de frutos. A andromonoiccia encontrada em *A. colubrina* é o primeiro registro para o gênero. A relação de 1:1 entre número de grãos de pólen por políade e número de óvulos por flor é comum na subfamília, com muitos casos de espécies onde uma políade é capaz de fecundar todos os óvulos de uma flor. A espécie é autoincompatível e, portanto, dependente de vetores de pólen para a reprodução, mostrando-se generalista em relação aos polinizadores. Por apresentar floração em massa e na estação seca, cada indivíduo florido de *A. colubrina* torna-se uma importante fonte de recurso para a fauna local.

Palavras-chave: Andromonoiccia; Autoincompatibilidade; Biologia floral; Caatinga; Polinização generalista

Introdução

As Leguminosae constituem a terceira maior família de angiospermas e são componentes principais da maioria dos tipos vegetacionais do mundo (Lewis et al. 2005). Parte do sucesso da família é atribuída à grande elaboração de suas construções florais (Endress, 1994) e, nesse contexto, a subfamília Mimosoideae é a que apresenta a forma floral mais conservada (Queiroz, 2009). Algumas características marcantes no grupo são o grande desenvolvimento dos estames e a redução do perianto, originando flores do tipo pincel, e a redução do tamanho e o adensamento das flores, gerando uma compactação da inflorescência (Arroyo, 1981; Endress, 1994). Como consequência, a atratividade floral é exercida pelo androceu e, na maior parte das espécies, a unidade de polinização é a inflorescência (Arroyo, 1981; Endress, 1994).

Apesar da forma floral das Mimosoideae ser relativamente conservada, há grande variação na biologia floral, na ecologia da polinização e no sistema reprodutivo do grupo (ver Arroyo, 1981; Kenrick, 2003; Koptur, 1983; Stone et al., 2003; Vogel, 1990, Vogel et al., 2005). No entanto, provavelmente devido ao diminuto tamanho das flores de grande parte de suas espécies e ao arranjo denso das inflorescências, que geram dificuldades metodológicas de manipulação, a subfamília é relativamente pouco estudada com relação à biologia reprodutiva. Para a tribo Mimoseae, a maior da família, isto é particularmente expressivo.

A maioria dos taxa da tribo Mimoseae ocorre em áreas semiáridas não tolerantes ao fogo, ricas em plantas suculentas e pobres em gramíneas, e 34% dos gêneros e 76% das espécies do grupo são endêmicas do continente americano (Schrire et al., 2005). A Caatinga, uma formação vegetacional que ocupa a maior parte do Nordeste do Brasil, é um exemplo desse tipo de área e, de fato, as Mimoseae se sobressaem como uma das tribos de leguminosas

mais ricas no ecossistema, com 10 gêneros e 55 espécies (cf. Queiroz, 2009), destacando-se, dentre elas, *Anadenanthera colubrina*.

O pequeno gênero arbóreo *Anadenanthera* Speg., endêmico do Novo Mundo, possui apenas duas espécies, *A. colubrina* e *A. peregrina* (Luckow, 2005). *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, popularmente conhecida como angico ou cebil, apresenta duas variedades, *cebil* e *colubrina*, sendo a variedade *cebil* a mais frequente e um dos clássicos exemplos de espécies que apresentam a distribuição do “Arco Pleistocênico”, proposta por Prado e Gibbs (1993) para explicar a ligação passada entre as florestas tropicais sazonais secas da América do Sul. O maior núcleo de distribuição da variedade é a Caatinga, principalmente as áreas de Caatinga arbórea, onde se torna um dos elementos dominantes (Prado e Gibbs, 1993; Queiroz, 2009). A espécie é bastante utilizada pelo homem, destacando-se o seu uso como madeira, alucinógeno e na curtição de couro (Luckow, 2005; Queiroz, 2009).

O objetivo deste trabalho foi investigar diversos aspectos da biologia reprodutiva de *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb.) Altschul, em uma área de Caatinga, incluindo a fenologia reprodutiva, o sistema sexual, a biologia floral, a ecologia da polinização e o sistema reprodutivo da espécie.

Material e métodos

Local do estudo

O estudo foi realizado entre outubro e dezembro de 2007 e em novembro de 2009 na Estação Experimental de Serra Talhada do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) (07°56'37.0''S, 38°17'42.3''O), localizada no município de Serra Talhada, estado de Pernambuco, Brasil, distante 430 km do litoral. A área encontra-se a uma altitude de 500 m e

apresenta temperatura e precipitação médias anuais de 24,8 °C e 679 mm, respectivamente (Ferraz et al., 2003). Há forte sazonalidade na precipitação pluviométrica, o que ocasiona déficit hídrico e a ocorrência de duas estações, uma chuvosa, geralmente de janeiro a maio, e uma seca, de junho a dezembro (Ferraz et al., 2003). A vegetação do local é a Caatinga, uma formação decídua, espinhosa, com plantas ramificadas e alta densidade de indivíduos, altura média de 4 m e altura máxima de 13 m e as principais famílias encontradas no local são Euphorbiaceae, Leguminosae e Anacardiaceae (Ferraz et al., 2003).

Como em áreas preservadas da estação as árvores de *A. colubrina* são muito altas (ca. 10 a 15 m), dificultando as observações e manipulações, os indivíduos utilizados para as observações de visitantes florais e experimentos de polinização controlada foram aqueles com parte da copa alcançável através do uso de escada, localizados em áreas da estação próximas a pastagens e plantações. Para as análises de flores e inflorescências foi utilizado material coletado tanto de indivíduos de áreas preservadas como de áreas degradadas.

Fenologia, Biologia Floral e Ecologia da Polinização

Entre os meses de outubro e dezembro de 2007 foram feitas excursões quinzenais à área do estudo, o que permitiu definir o período e a duração da floração de indivíduos e da população de *A. colubrina*. Em 2008, várias excursões foram realizadas à área do estudo, pelo menos a cada dois meses, sendo possível delimitar o período de dispersão dos frutos da espécie. A morfologia e a biologia floral foram analisadas com o auxílio de estereomicroscópio e microscópio óptico, utilizando-se material fresco e fixado. Os seguintes parâmetros foram avaliados a partir de inflorescências fixadas em pré-antese: número e sexualidade de flores por inflorescência e número de óvulos por flor (N = 10 indivíduos). O número de grãos de pólen por políade foi encontrado na literatura (Buriel *et al.*, *in press*),

sendo calculada a razão “número de grãos de pólen por políade / número de óvulos por flor”, isto é, quantas políades são necessárias para fecundar todos os óvulos de uma flor. Além disso, medidas florais foram feitas a partir de flores fixadas no primeiro dia de antese.

Como a disposição das partes reprodutivas masculinas em relação às femininas e a deiscência das anteras nos primeiros momentos da antese poderiam indicar a ocorrência de protandria, foi necessário investigar o período da função feminina das flores hermafroditas. Assim, a receptividade estigmática, bem como interações pólen-pistilo indicativas de mecanismos de autoincompatibilidade, foram observadas através de análises do crescimento de tubos polínicos em flores de diversos períodos da antese. Para isso, foram feitos tratamentos de autopolinização manual e polinização cruzada em flores previamente ensacadas em estágio de pré-antese com posterior coleta e fixação em intervalos de tempo pré-determinados. Os tratamentos foram os seguintes: (1) flores polinizadas apenas no primeiro dia de antese, (2) flores polinizadas apenas no segundo dia de antese e (3) flores polinizadas no primeiro e no segundo dia de antese. As polinizações ocorreram entre 0800 e 0900 h da manhã e a coleta e fixação das flores ocorreram 8h, 24h e 48 h após a polinização (este último horário somente para as inflorescências polinizadas no primeiro dia). O material foi preparado e observado sob microscopia de fluorescência segundo método proposto por Martin (1959).

Os visitantes florais foram observados com relação ao comportamento de visita em cinco árvores durante cinco dias em novembro de 2007 e três dias em novembro de 2009, totalizando ca. 60 horas de observação. Alguns espécimes foram coletados para posterior identificação, tendo sido depositados como espécimes-testemunho na coleção entomológica do Laboratório de Biologia Floral e Reprodutiva da Universidade Federal de Pernambuco. Sempre que possível foram feitos registros fotográficos para auxiliar na descrição do comportamento de visita.

Sistema e Sucesso Reprodutivos

O sistema reprodutivo foi avaliado em 2007 através de tratamentos de polinização controlada em cinco indivíduos distando pelo menos 50 metros entre si. Algumas adaptações foram necessárias para a realização dos testes: (1) Devido à impossibilidade do completo isolamento de apenas uma flor, a inflorescência foi tratada como a unidade de polinização; (2) Como não foi possível emasculas as flores, uma vez que, em botão, corria-se o risco de machucar o estigma e no início da antese as anteras já estavam liberando pólen, os tratamentos de polinização cruzada foram chamados de polinização mista, uma vez que havia a possibilidade de haver deposição de autopólen junto ao pólen dos cruzamentos; e (3) Como não era possível visualizar os estigmas em meio aos filetes, as polinizações foram realizadas da seguinte maneira: as inflorescências doadoras de pólen foram previamente isoladas em pré-antese e coletadas no primeiro dia de antese, sendo então “pinceladas” sobre as inflorescências dos tratamentos.

Inflorescências em pré-antese foram isoladas com sacos semipermeáveis e, após o início da antese, os seguintes tratamentos foram realizados: autopolinização espontânea, autopolinização manual e polinização cruzada, sendo utilizadas de nove a doze inflorescências por tratamento para cada indivíduo, totalizando 54 inflorescências para autopolinização espontânea, 49 para autopolinização manual e 49 para polinização mista. No tratamento de autopolinização espontânea as inflorescências permaneceram intactas e isoladas por cerca de uma semana. Nos tratamentos de autopolinização manual e polinização cruzada as inflorescências foram polinizadas entre 0800 h e 1100 h da manhã por dois dias consecutivos, com pólen de inflorescências da mesma planta (geitonogamia) e de plantas diferentes, respectivamente, sendo desensacadas após uma semana. Embora *A. colubrina* apresente um longo período de frutificação (ca. 10 meses), as observações sobre a formação

dos frutos foram realizadas cinco e dezenove semanas após as polinizações controladas, quando os frutos imaturos já apresentavam tamanho avançado. Na observação de cinco semanas os frutos imaturos foram divididos em três categorias: (1) pequenos – até 2 cm; (2) médios – de 2 a 4 cm; e (3) grandes – acima de 4 cm. Além dos tratamentos mencionados anteriormente, 30 inflorescências por indivíduo foram marcadas e deixadas sob condições naturais para avaliação da formação natural de frutos. A partir dos resultados obtidos com os tratamentos de polinização controlada foi calculado o Índice de Autoincompatibilidade (IAI) (razão entre a porcentagem de frutos formados por autopolinização manual e a de frutos formados por polinização cruzada manual; modificado de Zapata e Arroyo, 1978).

Resultados

Fenologia, Biologia Floral e Ecologia da Polinização

Anadenanthera colubrina floresceu do final de outubro ao início de dezembro, período que corresponde ao auge e final da estação seca no local do estudo. A espécie mostrou-se caducifólia, sendo que alguns indivíduos permaneceram sem folhas durante a floração, rebrotando no início da frutificação (entre novembro e dezembro), enquanto outros apresentaram brotamento foliar concomitante à produção de flores, a qual, em ambos os casos, ocorreu em massa e durante cerca de três semanas por indivíduo.

As flores de *A. colubrina* são agregadas em inflorescências axilares do tipo glomérulo, cada gema produzindo de duas a cinco inflorescências que se desenvolvem sequencialmente. Cada glomérulo apresenta flores masculinas e flores hermafroditas, sendo, portanto, heteromórfico, e a espécie, andromonóica. O número total de flores e a proporção entre flores masculinas e hermafroditas variaram de inflorescência para inflorescência e entre indivíduos,

mas a distribuição seguiu uma tendência: as flores hermafroditas encontraram-se na região superior da inflorescência, enquanto as masculinas distribuíram-se na região inferior. Em média, o número de flores por glomérulo foi de 87,1 ($\pm 11,11$; 76-110), sendo 49,1 flores masculinas ($\pm 19,29$; 20-80) e 38 hermafroditas ($\pm 18,33$; 13-60) e a média das razões de flores masculinas por flores hermafroditas foi de 2,01 ($\pm 1,87$; 0,36-6,15) (N = 10 inflorescências). Exceto pela supressão do pistilo, não há outras diferenças morfológicas entre os dois tipos de flores.

As flores são sésseis, pentâmeras e actinomorfas, de cor branca a creme, gamossépalas e gamopétalas. Tanto o cálice como a corola, com comprimento médio de 2,0 e 3,5 mm, respectivamente (N = 5 flores), apresentam pequenas lacínias curtas e eretas. O androceu é constituído por 10 estames com longos filetes, maiores do que a corola, com comprimento médio de 9,0 mm. O tipo floral é, portanto, pincel (*sensu* Faegri e Pijl, 1979). As anteras apresentam uma glândula apical, que cai durante as primeiras horas da antese. O gineceu, com comprimento médio de 6,0 mm, mais curto que o androceu, é monocarpelar, com o ovário sobre um pequeno ginóforo. O número médio de óvulos por flor foi 16 ($\pm 1,05$; 15-18) e, de acordo com Buriel *et al.* (*in press*), as políades são constituídas por 16 grãos de pólen, originando uma razão “grãos de pólen por políade / óvulo” de 1:1, isto é, uma políade é capaz de fecundar todos os óvulos de uma flor.

A antese é diurna e as flores começam a abrir durante a madrugada (ca. 02 00 h). Na maioria das inflorescências, todas as flores se abrem em um único dia, mas há casos em que apenas uma parte das flores se abre em um mesmo dia, ocorrendo a abertura das outras flores nos dias seguintes. Com o início da abertura do cálice e da corola, os estames e o estilete, que se achavam totalmente retorcidos dentro da flor, começam o processo de distensão, encontrando-se eretos no início da manhã (ca. 0600 h). Já no início da antese ocorre a deiscência das anteras, que liberam a maior parte do pólen nas primeiras horas do dia, entre

0700 h e 1000 h. As análises da receptividade estigmática mostraram tubos polínicos crescendo em pistilos polinizados tanto no primeiro como no segundo dia de antese, mostrando, portanto, que os estigmas estão receptivos desde o primeiro dia. Embora o máximo de distensão dos filetes ocorra no primeiro dia, durante o segundo dia eles ainda encontram-se distendidos e com altura superior à dos pistilos. No terceiro dia, os filetes começam a murchar perceptivelmente, enquanto os pistilos continuam eretos. Durante o mesmo período, o ovário também passa por mudanças consideráveis no tamanho e na coloração, apresentando-se menor e totalmente verde no primeiro dia, verde na metade inferior e avermelhado na metade superior durante o segundo dia, e completamente vermelho escuro e intumescido no terceiro dia. As flores permanecem presas à inflorescência, ainda que murchas, durante vários dias, desprendendo-se em torno de uma semana após o início da antese.

As abelhas *Apis mellifera* (Fig. 1A) e *Trigona spinipes* (Fig. 1B) (Apidae) foram os visitantes mais freqüentes, mas outros insetos, como a borboleta *Hemiargus hanno* (Fig. 1C) (Lycaenidae), as vespas *Polybia occidentalis* e Vespidae sp. (Fig. 1D) (Vespidae) e pequenos besouros (Coleoptera) também foram observados. Com exceção dos besouros, que ficavam por entre as flores bebendo néctar ou coletando pólen que havia caído das anteras, sendo considerados pilhadores, todos os outros visitantes apresentaram os mesmos comportamentos de visita. Após o pouso, eles caminhavam sobre a inflorescência, detendo-se em algumas flores para beber néctar e continuando a busca após consumir o recurso de uma flor. Esse comportamento permitia o contato das partes reprodutivas das flores com a região ventral, as pernas e a cabeça dos visitantes, que atuaram, então, como polinizadores efetivos. Em geral, as abelhas visitavam várias flores por inflorescência e várias inflorescências por indivíduo, enquanto a borboleta e as vespas realizavam visitas mais esporádicas e curtas em comparação às abelhas.

Diversos visitantes florais foram observados tanto em inflorescências jovens, recém-abertas, como em inflorescências velhas, com vários dias de antese e todos foram vistos consumindo néctar em pelo menos três das visitas, mas nem todas as visitas eram necessariamente para consumo de néctar. Pólen também foi um recurso obtido pelas abelhas, que foram observadas várias vezes limpando o corpo, principalmente após as visitas do início da manhã. Além de visitar inflorescências abertas para beber néctar, *Hemiargus hanno* foi observada com grande frequência ovipositando em inflorescências ainda em fase de botão. Ao analisar inflorescências fixadas, diversas larvas de insetos foram encontradas. Assim, algumas visitas de vespas também podem ter ocorrido pela busca por essas larvas.

Sistema e Sucesso Reprodutivos

Cinco semanas após o início dos experimentos, todos os tratamentos apresentaram frutos imaturos, mas com uma diferença na quantidade (Tabela 1) e no nível de desenvolvimento (Tabela 2), com os maiores valores encontrados no tratamento de polinização mista. Todos os indivíduos formaram frutos após polinizações mistas, mas apenas três e dois indivíduos iniciaram o desenvolvimento de frutos após autopolinizações manuais e espontâneas, respectivamente. Ao final do período de observações, ca. 19 semanas, não restou nenhum fruto de autopolinização espontânea e nenhum de polinização natural. Apenas um fruto de autopolinização manual continuava a se desenvolver, contra oito oriundos de polinização mista e o Índice de Autoincompatibilidade foi de 0,1. Nos tratamentos de polinização natural e autopolinização espontânea e manual, no máximo um fruto iniciou desenvolvimento por inflorescência, enquanto nas polinizações mistas até seis frutos foram encontrados em uma única inflorescência cinco semanas após os testes. No entanto, ao final do período de observações, as inflorescências portavam apenas um fruto, à exceção de uma

inflorescência de polinização mista, que continha dois frutos. As análises de crescimento de tubo polínico mostraram tubos crescendo no estigma e no estilete, mas até 48h após a polinização nenhum óvulo havia sido penetrado, tanto em flores oriundas de polinização cruzada quanto de autopolinização manual.

Discussão

Com floração em massa e no auge da estação seca, cada indivíduo florido de *A. colubrina* torna-se uma importante fonte de recurso (néctar, pólen e até local para nidificação) para a fauna local. A espécie se mostrou generalista com relação aos visitantes florais, sendo polinizada principalmente por abelhas, mas a presença de espécies de vespas e uma de borboleta não deve ser desconsiderada. Apesar de ter ocorrido iniciação da formação de frutos após autopolinização manual e espontânea, a produção foi muito baixa e houve heterogeneidade entre os indivíduos com relação a este tratamento. Uma vez que a formação de frutos após polinizações mistas foi homogênea e maior que os demais tratamentos, e com um IAI de 0,1, a espécie deve ser considerada autoincompatível e, portanto, dependente de vetores de pólen para a reprodução.

A andromonoiccia encontrada em *Anadenanthera colubrina* é o primeiro registro para o gênero e um novo registro para Mimosoideae, uma vez que a espécie e o gênero sempre foram relatados como hermafroditas em descrições taxonômicas (e.g. Altschul, 1964; Queiroz, 2009). Cerca de metade dos gêneros da subfamília produz flores masculinas e hermafroditas no mesmo indivíduo, porém, a expressão sexual de flores e inflorescências nem sempre é um caráter fixo e gradientes morfológicos intra e interpopulacionais já foram descritos (Arroyo, 1981). Como houve uma grande variação nas razões entre flores masculinas e hermafroditas (de 0,36 a 6,15) em e entre os indivíduos analisados, é possível que *A. colubrina* também

apresente indivíduos e populações hermafroditas, fato que apenas uma análise em grande parte de sua área de ocorrência poderia esclarecer. Além disso, seria interessante avaliar também *A. colubrina* var. *colubrina* e *A. peregrina*, para compreender até onde a variação na expressão sexual ocorre na espécie e no gênero.

A ampla ocorrência de andromonoiccia em Mimosoideae parece estar relacionada à transformação da inflorescência na unidade de polinização, característica da subfamília. A hipótese mais aceita para a evolução da andromonoiccia seria a regulação da energia reprodutiva (Arroyo, 1981; Zapata e Arroyo, 1978): uma vez que a proporção de flores que se transformam em frutos é muito baixa em várias espécies, a produção de várias flores masculinas e apenas algumas flores hermafroditas aperfeiçoaria o uso da energia reprodutiva, sem a diminuição da atratividade das inflorescências e o prejuízo da função masculina (dispersão de pólen). No entanto, como várias espécies de angiospermas apresentam altas taxas de aborto de flores, mas relativamente poucas são andromonóicas, Bawa e Beach (1981) levantaram algumas situações em que a andromonoiccia não seria vantajosa. De acordo com os autores, o não desenvolvimento de pistilos seria desvantajoso nos seguintes casos: quando há modificação da morfologia floral e conseqüente desorganização do sistema de polinização; quando há possibilidade de restrição na eficiência de seleção de progênie através de interações pólen-pistilo e reações pós-fecundação; e quando não há previsibilidade para as flores, antes da polinização, com relação ao seu destino como doadoras ou receptoras de pólen. As flores do tipo pincel e as inflorescências compactadas das Mimosoideae provavelmente não teriam sua atratividade alterada pela supressão do pistilo, fator que favorece a evolução da andromonoiccia. Porém, a seleção de progênie e a imprevisibilidade no destino da flor como doadora ou receptora de pólen poderiam variar de acordo com a forma da inflorescência. Por exemplo, inflorescências glomerulares provavelmente possuem uma maior proporção de flores visitadas ou que entram em contato com o corpo de um visitante floral do que

inflorescências em espiga, o que aumentaria a possibilidade de ovários fecundados e a seleção de progênie, bem como maior previsibilidade no destino de mais flores. Dessa forma, é de se esperar que a andromonoiccia seja mais frequente em espécies com inflorescências globosas e, de fato, Arroyo (1981) encontrou que em Mimosoideae a andromonoiccia é muito mais frequente em gêneros com inflorescências do tipo capítulo (glomérulo), como é o caso de *A. colubrina*.

Ao final das observações, todos os seis frutos oriundos do tratamento de polinização natural haviam sido abortados, embora as árvores ainda amadurecessem outros frutos, indicando que são necessárias mais de 30 inflorescências para cada fruto formado na espécie. O aborto de flores e frutos imaturos é comum em espécies de árvores tropicais, tendo sido alvo de várias pesquisas que tentaram investigar suas causas (Bawa e Webb, 1984). No caso de *A. colubrina*, enquanto o alto índice de aborto de flores parece estar relacionado à falta de polinização, às autopolinizações e à geitonogamia, o aborto de frutos, inclusive de alguns frutos oriundos de polinizações mistas, provavelmente tem ligação com ajustes entre os recursos disponíveis e a seleção de progênie feita pela planta mãe. Em um estudo que testou a hipótese de maturação seletiva de frutos na Mimosoideae *Acacia caven*, Torres et al. (2002) encontraram diferenças significativas entre germinação e parâmetros quantitativos de plântulas provenientes do tratamento controle (seleção natural de frutos pela planta mãe) e daquelas oriundas do tratamento experimental (seleção aleatória de frutos pelos pesquisadores), com melhor performance das sementes e plântulas do tratamento controle. Nos tratamentos de polinização mista realizados em *Anadenanthera colubrina*, até seis frutos foram encontrados em uma única inflorescência cinco semanas após as polinizações, mas após 19 semanas, apenas um fruto restava em cada inflorescência avaliada, a exceção de uma inflorescência que portava dois frutos, indicando que houve seleção de progênie.

A seleção de progênie pode ter uma ligação estreita com outra questão importante que se junta às altas taxas de geitonogamia: a de cruzamentos entre indivíduos aparentados (endogamia). *Anadenanthera colubrina* apresenta padrão de distribuição espacial do tipo agregado (Silva e Barbosa, 2000), possui dispersão autocórica de sementes e, uma vez que uma única políade é capaz de fecundar todos os óvulos de uma flor, originando um fruto cujas sementes produzem irmãos completos, é razoável pensar que as manchas de árvores da espécie apresentam grandes proporções de indivíduos aparentados. Com uma pequena distância de vôo (840 m; Kerr, 1987 *apud* Araújo et al., 2004), a abelha *Trigona spinipes*, principal polinizador autóctone de *A. colubrina*, provavelmente promove uma grande quantidade de geitonogamia e de endogamia na espécie. Assim, apesar de alguns cruzamentos, a princípio, não serem incompatíveis, efeitos deletérios provenientes de endogamia (depressão endogâmica) podem ocasionar má formação, aborto e menor vigor de sementes e frutos (Charlesworth e Willis, 2009). Porém, uma vez que nem todos os indivíduos de uma mesma mancha florescem ao mesmo tempo (observações pessoais), a taxa de cruzamentos entre indivíduos aparentados pode ser reduzida. Além disso, seria interessante avaliar a eficiência da abelha introduzida *Apis mellifera*, que, com uma distância de vôo de até 9,5 km (Beekman e Ratnieks, 2000), pode se mostrar um vetor eficiente para o fluxo polínico a grandes distâncias. Portanto, a autoincompatibilidade e a seleção de progênie em *A. colubrina* explicam a baixa formação de frutos na espécie, mas são, ao mesmo tempo, fatores-chave para a manutenção de sua diversidade genética.

Agradecimentos

Ao Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), pela permissão para realização do estudo na Estação Experimental de Serra Talhada; a Gilcean Jones, pela ajuda no trabalho de

campo; A Carlos Eduardo Nobre, pela identificação da borboleta, e Gisele Azevedo, pela identificação da vespa; A Marcelo Guerra, pela permissão para uso do microscópio de fluorescência do Laboratório de Citogenética Vegetal, UFPE; Ao CNPq, pela bolsa de doutorado concedida a L. Borges e pelas bolsas de produtividade em pesquisa concedidas a I. Machado e A. Lopes, além do apoio financeiro concedido a projeto de pesquisa coordenado por A. Lopes (Processo CNPq nº 567739/2008-2).

Referências

- Ancibor, E. 1969. Los nectarios florales en Leguminosas-Mimosóideas. *Darwiniana*, 15: 128-142.
- Altschul, S.R. 1964. A taxonomic study of the genus *Anadenanthera*. *Contribs. Gray Herb. Univ. Harvard* 193, 1-65.
- Araújo, E.D., Costa, M., Chaud-Netto, J., Fowler, H.G. 2004. Body size and flight distance in stingless bees (Hymenoptera: Meliponini): inference of flight range and possible ecological implications. *Braz. J. Biol.* 64, 563-568.
- 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.
- Bawa, K.S., Beach, J.H. 1981. Evolution of Sexual Systems in Flowering Plants. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 68, 254-274.
- Bawa, K.S., Webb, C.J. 1984. Flower, fruit and seed abortion in tropical forest trees: implications for the evolution of paternal and maternal reproductive patterns. *Am. J. Bot.* 71, 736–751.

- Beekman, M., Ratnieks, F.L.W. 2000. Long-range foraging by the honey-bee, *Apis mellifera* L. *Funct. Ecol.* 14, 490-496.
- Buril, M.T., Santos, F.A.R., Alves, M., 2009. Diversidade polínica das Mimosoideae (Leguminosae) ocorrentes em uma área de caatinga, PE, Brasil. *Acta Bot. Bras. in press.*
- Charlesworth, D., Willis, J.H., 2009. The genetics of inbreeding depression. *Nat. Rev. Genet.* 10, 783-796.
- Endress, P.K. 1994. *Diversity and Evolutionary Biology of Tropical Flowers*. Cambridge Tropical Biology Series. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Faegri, K., Pijl, L., 1979. *The Principles of Pollination Ecology*. Pergamon Press, London.
- Ferraz, E.M.N., Rodal, M.J.N., Sampaio, E.V.S.B. 2003. Physiognomy and structure of vegetation along an altitudinal gradient in the semi-arid region of northeastern Brazil. *Phytocoenologia* 33, 71-92.
- Kenrick, J. 2003. Review of pollen-pistil interactions and their relevance to the reproductive biology of *Acacia*. *Aust. Syst. Bot.* 16, 119-130.
- Koptur, S. 1983. Flowering Phenology and Floral Biology of *Inga* (Fabaceae: Mimosoideae). *Syst. Bot.* 8, 354-368.
- Kraus, J.E., Arduin, M. 1997. *Manual Básico de Métodos em Morfologia Vegetal*. Editora Universidade Rural Seropédica, Rio de Janeiro.
- Lewis, G.P., Elias, T.S. 1981. Tribe 3. Mimoseae Bronn (1822). In: Polhill, R.M., Raven, P.H. (Eds.), *Advances in Legume Systematics, Part 1*. Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 155-168.
- Lewis, G.P., Schrire, B., Mackinder, B., Lock, M. 2005. *Legumes of the world*. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Luckow, M., 2005. Tribe Mimoseae. In: Lewis, G.P., Schrire, B., MacKinder, B., Lock, M. (Eds.), *Legumes of the World*. Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 163-183.

- Martin, F.M. 1959. Staining and observing pollen in the style by means of fluorescence. *Stain Technol.* 34, 125-128.
- Pires, J.P.A., Freitas, L. 2008. Reproductive biology of two tree species of Leguminosae in a Montane Rain Forest in southeastern Brazil. *Flora* 203, 491-498.
- Prado, D.E., Gibbs, P.E., 1993. Patterns of Species Distributions in the Dry Seasonal Forests of South America. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 80, 902-927.
- Queiroz, L.P., 2009. Leguminosas da Caatinga. Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.
- Schrire, B.D., Lewis, G.P., Lavin, M. 2005. Biogeography of the Leguminosae. In: Lewis, G.P., Schrire, B., MacKinder, B., Lock, M. (Eds.), *Legumes of the World*. Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 21-54.
- Sedgley, M., Harbard, J., Smith, R-M.M., Wickneswari, R., Griffin, A.R. 1992. Reproductive Biology and Interspecific Hibridisation of *Acacia mangium* and *Acacia auriculiformis* A. Cunn. Ex Benth. (Leguminosae: Mimosoideae). *Aust. J. Bot.* 40, 37-48.
- Silva, L.M.B., Barbosa, D.C.A. 2000. Crescimento e sobrevivência de *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan (Leguminosae), em uma área de Caatinga, Alagoinha, PE. *Acta bot. bras.* 14, 251-261.
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J. 1995. *Biometry – The principles and practice of statistics in biological research*. W. H. Freeman and Company, New York.
- Stone, G.N., Raine, N.E., Prescott, M., Willmer, P.G. 2003. Pollination Ecology of Acacias (Fabaceae, Mimosoideae). *Aust. Syst. Bot.* 16, 103-118.
- Torres, C., Eynard, M.C., Aizen, M.A., Galetto, L. 2002. Selective fruit maturation and seedling performance in *Acacia caven* (Fabaceae). *Int. J. Plant Sci.* 163, 809-813.
- Tybirk, K. 1993. Pollination, breeding system and seed abortion in some African *Acacia* species. *Bot. J. Linn. Soc.* 112, 107-137.

Vogel, S., 1990. Radiación adaptativa del síndrome floral em las familias neotropicales. Bol. Acad. Nac. Cienc. Cordoba 59, 5–30.

Vogel, S. 1997. Remarkable nectaries: structure, ecology, organophyletic perspectives. I. Substitutive nectaries. Flora 192, 305-333.

Vogel, S., Lopes, A.V., Machado, I.C. 2005. Bat pollination in the NE Brazilian endemic *Mimosa lewisii*: an unusual case and first report for the genus. Taxon 54, 693-700.

Zapata, T.R., Arroyo, M.T.K., 1978. Plant reproductive ecology of a secondary deciduous tropical forest in Venezuela. Biotropica 10, 221–230.

Tabela 1. Formação de frutos após polinizações controladas e naturais em *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Leguminosae - Mimosoideae), no município de Serra Talhada, Pernambuco, Brasil.

Tratamento	Infl. (N)	5 semanas		19 semanas	
		Infl. com fruto	Frutos imaturos (N)	Infl. com fruto	Frutos imaturos (N)
Polinização natural	150	6 (4%)	6	0	0
Autopolinização espontânea	54	3 (5,55%)	3	0	0
Autopolinização manual	49	5 (9,61%)	5	1 (1,92%)	1
Polinização mista*	49	23 (46%)	51	7 (14,28%)	8

* Corresponde à polinização cruzada em inflorescências que não foram emasculadas, podendo haver certo grau de autopolinização.

Tabela 2. Distribuição por categorias de tamanho dos frutos ainda imaturos oriundos de polinizações controladas e naturais após cinco semanas da realização dos tratamentos em *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Leguminosae - Mimosoideae), no município de Serra Talhada, Pernambuco, Brasil. Frutos pequenos: até 2 cm; frutos médios: de 2 a 4 cm; frutos grandes: acima de 4 cm.

Tratamento	Frutos imaturos		
	Pequenos	Médios	Grandes
Polinização natural	2	1	3
Autopolinização espontânea	1	2	0
Autopolinização manual	3	2	0
Polinização mista*	18	11	15

* Corresponde à polinização cruzada em inflorescências que não foram emasculadas, podendo haver certo grau de autopolinização.



Fig. 1. Polinizadores de *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Leguminosae-Mimosoideae) em Serra Talhada, Pernambuco, Brasil. (A) *Apis mellifera*; (B) *Trigona spinipes*; (C) *Hemiargus hanno*; (D) Vespidae sp.

CAPÍTULO DOIS

**ISOLAMENTO REPRODUTIVO ENTRE CITÓTIPOS DIPLÓIDES E
TETRAPLÓIDES DE *LIBIDIBIA (CAESALPINIA) FERREA*
(LEGUMINOSAE): IMPLICAÇÕES ECOLÓGICAS E TAXONÔMICAS**

MANUSCRITO A SER ENVIADO AO PERIÓDICO

TAXON

Isolamento reprodutivo entre citótipos diplóides e tetraplóides de *Libidibia (Caesalpinia) ferrea* (Leguminosae): implicações ecológicas e taxonômicas

Laís Angélica Borges^a, Luiz Gustavo R. Souza^a, Marcelo Guerra^b, Isabel Cristina Machado^b,
Ariadna Valentina Lopes^{b*}

^a Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Departamento de Botânica, CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Prof. Nelson Chaves, s/nº, Cidade Universitária, 50372-970, Recife, PE, Brasil

^b Departamento de Botânica, CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Prof. Nelson Chaves, s/nº, Cidade Universitária, 50372-970, Recife, PE, Brasil

* Autor para correspondência. E-mail: avflop@ufpe.br, ariadna.lopes@pq.cnpq.br

Resumo

Poliploidia é a variação cariotípica mais frequente e o mecanismo cromossômico mais comum envolvido na evolução das plantas. Porém, o surgimento de indivíduos poliplóides não é garantia para o estabelecimento de uma linhagem e, nesse aspecto, as relações entre poliploidia e biologia reprodutiva são relevantes. *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz (anteriormente *Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul.) é uma Leguminosae arbórea nativa do Brasil que apresenta populações diplóides e tetraplóides. O objetivo deste trabalho foi investigar a biologia reprodutiva da espécie, incluindo observações sobre morfologia, biologia e visitantes florais, sistema e sucesso reprodutivo dos dois citótipos, além de verificar o grau de isolamento reprodutivo entre eles. O estudo foi realizado entre 2008 e 2009 nos municípios de Alagoinha e Poção, Pernambuco, Nordeste do Brasil. *Libidibia ferrea* apresentou floração em massa, relativamente assincrônica e na transição entre as estações seca e chuvosa. Houve diferença significativa entre os citótipos com relação a todos os parâmetros morfométricos avaliados, como o tamanho da corola e o número de óvulos, maiores nos tetraplóides. Os polinizadores efetivos, abelhas nativas dos gêneros *Centris* e *Xylocopa*, e a introduzida *Apis mellifera*, não diferiram entre os citótipos, porém, devido à diferença entre o tamanho dos estames dos dois grupos, é possível que haja separação espacial do pólen de diplóides e tetraplóides no corpo da abelha. Enquanto os diplóides se mostraram autoincompatíveis (IAI=0) e com elevado percentual de formação de frutos oriundos de polinização cruzada intraploidia (20%), os tetraplóides foram autocompatíveis (IAI = 0,47) e obtiveram apenas 3,9% de formação de frutos através de polinização cruzada intraploidia. Ambos os citótipos apresentaram baixa formação natural de frutos e sementes e nenhum fruto foi formado através de cruzamentos entre diplóides e tetraplóides. Os dados obtidos são discutidos em relação ao estabelecimento de poliplóides e ao padrão de distribuição da espécie e suas implicações

taxonômicas são uma importante contribuição para uma espécie com classificação problemática como *L. ferrea*.

Palavras-chave: Autopoliplóide, Biologia Reprodutiva, Caatinga, Fluxo Gênico, Poliploidia, Reflorestamento

Título abreviado: **Isolamento reprodutivo entre citótipos de *Libidibia ferrea***

Introdução

Poliploidia, a multiplicação de conjuntos completos de cromossomos, é um fenômeno importante na evolução de muitas linhagens de eucariotos (Ramsey & Schemske, 1998). Nas plantas, é a variação cariotípica mais frequente e o mecanismo cromossômico mais comum envolvido na evolução do grupo (Guerra, 2008), com ocorrência estimada em até 70 % das angiospermas (Masterson, 1994). Por afetar todo o genoma, vários aspectos fenotípicos podem ser influenciados de uma só vez pela poliploidia (Husband & al., 2008). Partindo de seu efeito mais imediato, ou seja, o aumento do tamanho celular, a multiplicação do genoma traz diversas mudanças aos organismos poliplóides em relação a seus progenitores diplóides, incluindo alterações morfológicas, fisiológicas e ecológicas (Stebbins, 1940; Levin, 2002). Algumas dessas modificações podem ser adaptativas e muitas vezes os organismos poliplóides adquirem características que os tornam aptos a suportar condições diferentes das de seus ancestrais diplóides, podendo ocupar novos nichos ecológicos (Ramsey & Schemske, 1998; Levin, 2002).

Mas o surgimento de indivíduos poliplóides não é garantia de que uma nova linhagem vá se estabelecer (Fawcett & Van de Peer, 2010) e, nesse aspecto, as relações entre poliploidia e biologia reprodutiva são relevantes. Embora existam exemplos de diferentes citótipos ocupando a mesma área, em geral diplóides e poliplóides apresentam distribuições geográficas distintas (Thompson & Lumaret, 1992). Levin (1975) argumenta que, além de diferenças ecológicas não notadas a princípio por um observador, uma forte explicação para esse padrão de distribuição seria a relação entre o sucesso reprodutivo e a frequência de um citótipo. Denominado “Exclusão do Citótipo em Minoria” (“Minority Cytotype Exclusion”), o modelo de Levin demonstra que, uma vez que cruzamentos entre diplóides e tetraplóides geram zigotos triplóides, que são inviáveis ou quase totalmente estéreis, quanto menor a

frequência de um citótipo, menor a proporção de cruzamentos compatíveis e, portanto, menor o seu sucesso reprodutivo. Essa desvantagem é amplificada nas gerações posteriores, cada vez menores e, assim, o citótipo em minoria é eliminado da população.

Demonstrada empiricamente por Husband (2000) e posteriormente aprofundada (ver Fowler & Levin, 1984; Felber, 1991; Rodríguez, 1996), a exclusão do citótipo em minoria continua sendo o principal modelo para explicar as condições de estabelecimento de um poliplóide em uma população diplóide. De acordo com esses trabalhos, os principais fatores que poderiam contrabalançar ou retardar os efeitos da menor frequência de um citótipo seriam: as taxas de produção de gametas não reduzidos (relacionadas com a formação de novos poliplóides); a separação de nicho, a tolerância e frequência de autopolinizações e a imigração de pólen e sementes (todos relacionados com o aumento do sucesso reprodutivo do citótipo em minoria); e efeitos estocásticos. Alguns desses fatores são independentes da poliploidização, mas dois deles podem ser bastante afetados pelo aumento no nível de ploidia e são passíveis de seleção natural, podendo aumentar as chances de estabelecimento dos poliplóides: a separação de nicho e a tolerância e frequência de autopolinizações, ambos relacionados à biologia reprodutiva de uma espécie.

Como revisado por Levin (2002), a poliploidia pode ter vários impactos na reprodução de uma planta. Dentre as alterações mais comuns estão a quebra da autoincompatibilidade ou mesmo a mudança de reprodução sexuada para assexuada, via apomixia (Levin, 1983; Barringer, 2007); a mudança no sistema sexual de uma espécie, através da quebra da autoincompatibilidade e o consequente aumento da depressão endogâmica, com posterior invasão de plantas mutantes unissexuais, impossibilitadas de autogamia (ver Miller & Venable, 2000); diferenças fenológicas devido ao atraso ou avanço no período de floração (e.g. Husband & Schemske, 2000); e mudanças na atratividade floral, devido ao aumento no tamanho e na quantidade de recurso, com consequências importantes para as interações

planta-polinizador (e.g. Segraves & Thompson, 1999). Todas essas alterações têm consequências tanto para a separação de nicho, como para a tolerância e frequência de autopolinizações. Assim, percebe-se por que os aspectos da biologia reprodutiva de uma planta estão entre os mais significativos para o estabelecimento de uma linhagem poliplóide.

Em um estudo citogenético realizado com várias espécies de angiospermas, Beltrão & Guerra (1990) encontraram indivíduos diplóides ($2n = 24$) e tetraplóides ($2n = 48$) em *Libidibia ferrea* (Leguminosae – Caesalpinioideae) e, baseados em similaridades cariotípicas entre os dois citótipos, os autores sugeriram ser um caso de autopoliploidia. *Libidibia ferrea* é uma árvore nativa do leste e nordeste do Brasil que apresenta ampla distribuição geográfica e grande variabilidade morfológica, atributo que levou à criação de diversas proposições de classificação infraespecífica (Lewis, 2005; Queiroz, 2009). É possível que essa alta variação morfológica seja decorrente da poliploidia encontrada na espécie. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi analisar vários aspectos da fenologia reprodutiva, morfologia floral e biologia reprodutiva de *L. ferrea*, incluindo observações tanto para indivíduos diplóides como para tetraplóides, e verificar o grau de isolamento reprodutivo entre os citótipos.

Materiais e Métodos

Espécie estudada

Libidibia (DC.) Schltldl. é um gênero neotropical segregado de *Caesalpinia*, com seis a oito espécies de árvores ou arbustos que ocorrem principalmente em florestas estacionais secas (Lewis, 2005). Recentemente, Queiroz (2009) propôs a nova combinação da única espécie do gênero nativa do Brasil, *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz, popularmente conhecida como jucá ou pau-ferro. A espécie ocorre no leste e nordeste do país,

em florestas estacionais secas e na Caatinga, um tipo de floresta seca com porte baixo e características xeromorfas encontrada no semiárido brasileiro (Lewis, 2005; Queiroz, 2009). Com grande variabilidade morfológica, atualmente são reconhecidas quatro variedades para a espécie: *Libidibia ferrea* var. *ferrea*, *L. ferrea* var. *glabrescens*, *L. ferrea* var. *leiostachya* e *L. ferrea* var. *parvifolia* (Queiroz, 2009). *Libidibia ferrea* var. *leiostachya* é restrita à floresta atlântica do Rio de Janeiro (Rizzini & Mattos-Filho, 1968), enquanto *L. ferrea* var. *parvifolia* ocorre tanto em áreas de floresta atlântica como em áreas de Caatinga, e *L. ferrea* var. *ferrea* e *L. ferrea* var. *glabrescens* são encontradas apenas na Caatinga (Queiroz, 2009). Portanto, a Caatinga é a única região onde três das quatro variedades podem ser encontradas.

Considerando que, em geral, organismos tetraplóides apresentam dimensões maiores do que os diplóides (Stebbins, 1940) e que um dos caracteres para o diagnóstico das diferentes variedades de *L. ferrea* é o tamanho dos folíolos (Queiroz, 2009), é possível que *L. ferrea* var. *parvifolia*, com folíolos menores do que 0,9 cm (Queiroz, 2009), seja constituída de indivíduos diplóides, enquanto *L. ferrea* var. *ferrea* e *L. ferrea* var. *glabrescens*, com folíolos maiores do que 1,5 cm (Queiroz, 2009), sejam constituídas por tetraplóides. Entre as duas últimas variedades, a diferença básica encontra-se na densidade de tricomas revestindo os folíolos, os quais são pubescentes em *L. ferrea* var. *ferrea*, e glabros em *L. ferrea* var. *glabrescens*. O presente trabalho incluiu as variedades *L. ferrea* var. *ferrea*, *L. ferrea* var. *parvifolia* e *L. ferrea* var. *glabrescens*, como será descrito a seguir na área do estudo.

Área do estudo

Através das informações presentes nas exsicatas de *L. ferrea* depositadas no herbário UFP da Universidade Federal de Pernambuco, foi possível concluir que todas as três variedades da espécie que ocorrem na Caatinga podem ser encontradas no Estado de

Pernambuco, Brasil. Assim, para a localização de uma área com ocorrência de indivíduos diplóides e tetraplóides relativamente próximos foi feita a análise do material da espécie coletado nesse Estado e disponível no herbário UFP. Baseando-se na relação entre poliploidia e aumento nas dimensões de um organismo, citada anteriormente, as exsicatas foram classificadas em: (1) potencialmente diplóides (folíolos com até 0,9 cm de comprimento) ou (2) potencialmente tetraplóides (folíolos com comprimento maior do que 1,5 cm). As exsicatas que apresentaram folíolos com dimensões intermediárias, gerando incerteza na classificação, não foram enquadradas em nenhuma das categorias e não foram consideradas para este estudo. De acordo com este levantamento prévio, a maioria das localidades apresentou apenas um citótipo e, além disso, uma tendência foi observada: indivíduos potencialmente diplóides ocorreram em áreas de florestas secas situadas próximas do litoral (como na Mata Pedra de Mesa, em Nazaré da Mata) ou em áreas com altitude mais elevada no interior do Estado (como o Parque Nacional do Catimbau, em Buíque), enquanto os indivíduos potencialmente tetraplóides localizaram-se por todo o interior do Estado, em áreas de Caatinga com altitudes inferiores a 800 m (dados não publicados).

Em seguida a esta etapa inicial, foram realizadas excursões a campo entre os anos de 2007 e 2008 para observações e coleta de sementes da espécie. Esse material foi utilizado na análise do nível de ploidia dos indivíduos amostrados (o método empregado é descrito a seguir) e determinação da(s) ploidia(s) ocorrentes em cada local. Espécimes-testemunho de indivíduos diplóides e tetraplóides foram depositados no Herbário UFP da Universidade Federal de Pernambuco.

Após a determinação do nível de ploidia de indivíduos das várias localidades amostradas, a área escolhida para a realização do estudo foi aquela compreendida entre os municípios de Alagoinha (08°29'S, 36°49'O), com indivíduos tetraplóides, e Poção (08°11'S, 36°42'O), cuja maioria dos indivíduos é diplóide, mas com ocorrência de alguns indivíduos

tetraplóides. Os diplóides encontrados encaixam-se na descrição de *L. ferrea* var. *parvifolia*, enquanto alguns tetraplóides encaixam-se na descrição de *L. ferrea* var. *ferrea* e outros na de *L. ferrea* var. *glabrescens*.

Os municípios escolhidos localizam-se a ca. 200 km do litoral, no semiárido do Estado de Pernambuco, e distam ca. 30 km entre si. Estão inseridos no Maciço da Borborema, mas a diferentes altitudes e condições dessa formação: Alagoinha, a ca. 700 m a.n.m., encontra-se nas Plataformas Aplainadas, e Poção, a ca. 1030 m a.n.m., encontra-se nas Superfícies de Níveis Elevados, onde a maior altitude e a disposição geográfica suavizam o clima, que apresenta maior umidade e temperaturas mais amenas, e conseqüentemente influenciam a vegetação (Araújo-Filho & al., 2000). Assim, Alagoinha apresenta maior temperatura média anual (21,6 °C) e menor precipitação pluviométrica anual (597 mm) do que Poção (19,5 °C e 753 mm, respectivamente) (LAMEPE, 2010). Aos baixos índices da precipitação pluviométrica soma-se a sua distribuição fortemente sazonal e, dessa forma, tem-se duas estações bem definidas, uma chuvosa e uma seca. Em Alagoinha, a estação chuvosa, de seis meses, ocorre de fevereiro a julho, enquanto em Poção o período chuvoso é de sete meses, de janeiro a julho (LAMEPE, 2010). A vegetação típica em Alagoinha é a Caatinga Hipoxerófila e em Poção existem tanto áreas de Caatinga Hipoxerófila, quanto Brejos de Altitude (Floresta Subcaducifólia), dependendo do lado em que se encontra da serra (Araújo-Filho & al., 2000). Embora a vegetação local esteja bastante alterada, especialmente para a obtenção de lenha e a criação pecuária, sendo os Brejos de Altitude as áreas mais atingidas (Araújo-Filho & al., 2000), é possível avistar vários indivíduos de *L. ferrea* por entre as pastagens, uma vez que a espécie é mantida por prover sombra e forragem para o gado.

Análises citogenéticas

O nível de ploidia de todos os indivíduos utilizados neste estudo foi determinado através da análise do número cromossômico de plântulas oriundas das sementes coletadas de cada indivíduo, utilizando-se de uma a três plântulas por árvore amostrada. As sementes foram escarificadas com ácido sulfúrico e postas para germinar em placas de Petri com papel filtro embebido em água destilada. Após a germinação, as pontas das radículas foram pré-tratadas com 8-hidroxiquinoleína (0,002M) a 10 °C por 24 horas, fixadas em etanol:ácido acético (3:1; v/v) à temperatura ambiente por 2 a 24 horas e armazenadas a – 20 °C. O material foi hidrolisado em HCl 5N e corado com Giemsa 2%, sendo observado em microscópio óptico para contagem cromossômica de células em metáfase. Nenhuma das sementes que germinaram apresentou poliembrionia.

Foram analisados também o número e a morfologia cromossômicos para os dois citótipos de *L. ferrea*. Para a preparação das lâminas, as pontas das raízes foram lavadas em água destilada e digeridas em solução de 2% celulase (Onozuka) - 20% pectinase (Sigma) a 37 °C por 90 minutos. O meristema foi macerado em uma gota de ácido acético 45% e a lamínula foi removida em nitrogênio líquido. O material foi corado com DAPI 2 µg/mL por 60 min (Barros e Silva & Guerra, 2010). As lâminas foram montadas em tampão glicerol-McIlvaine pH 7,0 (1:1) e novamente envelhecidas por três dias antes da análise no microscópio de fluorescência Leica DMLB. A captura de imagens foi feita com uma câmera de vídeo Cohu CCD e *software* Leica QFISH. As imagens foram posteriormente editadas no Adobe Photoshop CS3 versão 10.0.

Fenologia, morfologia e biologia floral

Entre os meses de dezembro de 2007 e março de 2008 e entre dezembro de 2008 e março de 2009 foram feitas excursões quinzenais à área do estudo, o que permitiu definir o

período e a duração da floração de indivíduos e das populações de *L. ferrea*. Através das excursões para coleta de frutos, realizadas em diversos meses de 2007 e 2008, foi possível delimitar o período de dispersão dos frutos da espécie. Observações sobre a morfologia e o tipo floral, o sistema sexual e a antese da espécie foram feitas para indivíduos diplóides e tetraplóides. Os seguintes parâmetros foram avaliados para cinco indivíduos de cada citótipo: 1) comprimento horizontal e vertical da corola; 2) comprimento total dos estames, do ovário e do estilete; 3) comprimento parcial do conjunto de estames e pistilo, medido do ápice das anteras e estigma até a pétala estandarte, o que corresponde à plataforma de pouso das abelhas durante a visita; 4) número de óvulos por flor; 5) viabilidade polínica; e 6) diâmetro equatorial dos grãos de pólen. Para os três primeiros parâmetros utilizou-se a média de três flores por indivíduo e para os três últimos foi utilizada a medida de uma flor por indivíduo. A viabilidade polínica foi avaliada através de coloração do citoplasma, segundo método proposto por Alexander (1980), avaliando-se 200 grãos por lâmina/antera, sendo quatro lâminas por indivíduo. O diâmetro equatorial dos grãos foi medido com ocular micrométrica, sendo avaliados 20 grãos de pólen por lâmina/antera. Como a única diferença entre as flores de tetraplóides das variedades *ferrea* e *glabrescens* é a pilosidade do ovário (Queiroz 2009), suas medidas foram agrupadas na categoria dos tetraplóides.

Visitantes florais

Os visitantes florais foram observados em seis indivíduos tetraplóides durante a floração de 2008 e em cinco indivíduos diplóides e cinco tetraplóides durante a floração de 2009, totalizando ca. 160 horas de observação distribuídas entre os meses de janeiro e fevereiro dos dois anos. De acordo com o comportamento de visita, os visitantes foram classificados em: 1) polinizadores efetivos, quando coletavam néctar e tocavam as partes

reprodutivas da flor com a região ventral do corpo, 2) polinizadores ocasionais, quando coletavam pólen e, devido à proximidade entre as anteras e o estigma, poderia ocorrer a polinização, ou quando coletavam néctar e ocasionalmente tocavam as partes reprodutivas da flor, e 3) pilhadores, quando coletavam néctar e nunca tocavam anteras e estigma. Espécimes foram coletados para posterior identificação, tendo sido depositados como material testemunho na coleção entomológica do Laboratório de Biologia Floral e Reprodutiva da Universidade Federal de Pernambuco. Sempre que possível foram feitos registros fotográficos para auxiliar na descrição do comportamento de visita.

Sistema reprodutivo e isolamento entre os citótipos

O sistema reprodutivo e o isolamento entre diplóides e tetraplóides de *L. ferrea* foram analisados através de tratamentos de polinização controlada realizados nos episódios reprodutivos de 2008 e 2009, entre janeiro e fevereiro de cada ano, sendo utilizados seis indivíduos tetraplóides de Alagoinha em 2008 e cinco indivíduos diplóides de Poção e cinco tetraplóides de Alagoinha (sendo dois reaproveitados do ano anterior) em 2009. Os indivíduos tetraplóides pertenciam às variedades *ferrea* e *glabrescens* e ambas atuaram como doadora e receptora de pólen. Todos os indivíduos receberam os tratamentos de autopolinização manual e polinização cruzada, os quais foram realizados em flores recém-abertas, previamente ensacadas com sacos semipermeáveis quando em estágio de pré-antese. Após as polinizações, as flores foram mantidas encobertas por dois dias, sendo então desensacadas e acompanhadas para a observação da formação de frutos.

Os tratamentos realizados foram os seguintes: (1) autopolinização manual (N = 160 flores, sendo 2 – 19 flores por indivíduo em 2008 e N = 10 flores por indivíduo em 2009); (2) polinização cruzada entre indivíduos do mesmo citótipo (intraploidia) (N = 201 flores, sendo

5 – 21 flores por indivíduo em 2008 e $N = 12$ flores por indivíduo em 2009); e (3) polinização cruzada entre indivíduos diplóides e tetraplóides (interploidia) ($N = 120$ flores, sendo 12 flores por indivíduo em 2009). Para as polinizações cruzadas, cada planta-mãe recebeu pólen de seis doadores em 2008, sendo utilizadas de uma a cinco flores por doador, e de quatro doadores de pólen diplóides e quatro tetraplóides em 2009, sendo utilizadas três flores da planta-mãe por doador. A partir dos resultados encontrados foi calculado o Índice de Autoincompatibilidade, isto é, a razão entre a porcentagem de frutos formados por autopolinização manual e a de frutos formados por polinização cruzada manual (modificado de Zapata & Arroyo, 1978), onde um valor até 0,2 indica uma espécie autoincompatível, enquanto um valor acima de 0,2 indica uma espécie autocompatível.

Sucesso reprodutivo

A formação natural de frutos dos indivíduos utilizados nos tratamentos de polinização controlada foi avaliada em 2009 através da marcação e acompanhamento de 30 flores por indivíduo (10 flores por dia durante três dias diferentes), as quais foram deixadas sob condições naturais. Com os valores encontrados, foi calculada a Eficácia Reprodutiva (razão entre a porcentagem de frutos formados sob condições naturais e a de frutos formados por polinização cruzada manual; *sensu* Zapata & Arroyo 1978).

Além disso, foi comparado o número médio de sementes por fruto nas seguintes categorias: (1) sementes intactas, (2) sementes predadas, (3) sementes abortadas e (4) total de sementes. Para essa avaliação foram utilizados frutos coletados em diversas localidades do Estado de Pernambuco, entre os anos de 2008 e 2009. Para os diplóides, utilizaram-se frutos de indivíduos ocorrentes nos municípios de Buíque, Caruaru, Cimbres, Itamaracá, Jaboatão dos Guararapes, Nazaré da Mata, Poção, São Lourenço da Mata e Vicência ($N = 15$

indivíduos, sendo 6 – 10 frutos por indivíduo, totalizando 135 frutos). Para os tetraplóides utilizaram-se frutos de indivíduos ocorrentes nos municípios de Alagoinha, Buíque, Caruaru, Poção, Serra Talhada e Venturosa (N = 20 indivíduos, sendo 4 – 10 frutos por indivíduo, totalizando 182 frutos). Com os dados de formação natural de frutos e sementes foi calculado o Sucesso Reprodutivo Pré-Emergente dos dois citótipos, que corresponde ao produto das razões fruto/flor e semente/óvulo (*sensu* Wiens & al., 1987).

Análises estatísticas

Para avaliar diferenças entre os parâmetros de morfometria floral, tamanho e viabilidade polínica e número médio de sementes de diplóides e tetraplóides, os dados foram comparados através do Teste t, com $\alpha = 0,05$. Para comparar os números médios de sementes dos dois citótipos nas categorias “intactas”, “predadas” e “abortadas” foi empregada uma Análise de Variância, com $\alpha = 0,05$, com Teste de Tuckey *a posteriori*. A normalidade dos dados e a homogeneidade das variâncias foram checadas através dos testes Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente (Sokal & Rohlf, 1995). Todos os testes foram realizados no software Statistica 7.0.

Resultados

Análises citogenéticas

A maioria das seis populações de *L. ferrea* analisadas apresentou apenas um citótipo. Uma população se mostrou diplóide (Nazaré da Mata, com dois indivíduos avaliados), três se

mostraram tetraplóides (Alagoinha, Pesqueira e Serra Talhada, totalizando doze indivíduos avaliados) e duas se mostraram mistas (Buíque e Poção, com dez indivíduos analisados).

Ambos os citótipos de *L. ferrea* apresentaram cromossomos pequenos ($> 3,18 \mu\text{m}$) com ocorrência de metacêntricos (M) e acrocêntricos (A), com conjunto haplóide básico $x = 8M + 4A$. Foram observados diplóides com $2n = 2x = 24 (16M + 8A)$ (Fig. 1A) e tetraplóides com $2n = 4x = 48 (32M + 16A)$ (Fig. 1B). Duas sementes analisadas, uma de um indivíduo tetraplóide (código P1_Cfg_2), ambas coletadas em Pesqueira-PE, foram hexaplóides, com $2n = 6x = 72 (48M + 24A)$.

Fenologia, morfologia e biologia floral

Libidibia ferrea floresceu de dezembro a fevereiro nos locais do estudo, período que corresponde à transição entre a estação seca e a chuvosa. A espécie apresentou floração em massa e, apesar das populações terem florescido por aproximadamente três meses, individualmente o episódio reprodutivo durou pouco mais de um mês, embora alguns indivíduos tenham ultrapassado essa marca e florescido por um período maior. Desse modo, tanto diplóides como tetraplóides mostraram-se assincrônicos. Em Poção, onde ocorrem os dois citótipos, a floração dos poucos indivíduos tetraplóides ocorreu durante o período em que havia diplóides em flor. O tempo de frutificação da espécie foi longo, ca. nove meses, e os frutos, indeiscentes, foram dispersos entre setembro e novembro, no auge da estação seca.

As inflorescências são do tipo panícula e as flores, com odor levemente adocicado, são hermafroditas, pentâmeras e zigomorfas, do tipo estandarte (*sensu* Faegri & Pil, 1979). O cálice é verde-claro e a corola é amarela, havendo pequenas máculas vermelhas na metade inferior da pétala estandarte, constituindo um guia de néctar (Figs. 2A--B). Os dez estames, com anteras de deiscência longitudinal, circundam o estilete (Figs. 2A--B) e estão dispostos

em duas séries, uma mais interna e uma mais externa. Com grande proximidade e pilosidade, os estames formam uma barreira de proteção ao néctar, que é produzido no hipanto. Apenas entre a base do estame central adaxial e dos dois laterais contíguos há certa separação, formando duas fendas, por onde os polinizadores podem obter o recurso floral, e mesmo essas aberturas encontram-se protegidas pela pétala estandarte. Sob o ovário súpero há um pequeno ginóforo e na extremidade do estilete relativamente longo encontra-se o estigma do tipo úmido, constituído por uma câmara e com pequenos tricomas ao redor da abertura estigmática. Em algumas flores, especialmente em diplóides, o pistilo se mostrava reduzido ou atrofiado.

Apesar da semelhança entre as flores de diplóides e tetraplóides, algumas diferenças puderam ser observadas, como a coloração mais intensa e a maior abertura das pétalas (Figs. 2A--B). Além disso, todos os parâmetros morfométricos analisados, como comprimento da corola e do ovário e número de óvulos, por exemplo, foram significativamente diferentes entre os dois citótipos, com os tetraplóides apresentando os maiores valores (Tabela 1). Também houve diferença significativa com relação ao tamanho dos grãos de pólen, cujos diâmetros foram de $6,90 \pm 0,16 \mu\text{m}$ para diplóides e $8,68 \pm 0,35 \mu\text{m}$ para tetraplóides ($t = -9,2941$; $p < 0,0001$), mas não entre a viabilidade polínica, de $97,16 \pm 2,31\%$ para diplóides e de $98,4 \pm 1,49\%$ para tetraplóides ($t = -1,4024$; $p = 0,1778$).

Ambos os citótipos apresentaram antese diurna, com duração de ca. 12 horas. As flores começavam a abrir no início da manhã, estando completamente abertas por volta das 0600 h. A deiscência das anteras iniciava às 0700 h e, ca. duas horas mais tarde, todas estavam abertas e o pólen, levemente pegajoso, estava totalmente disponível para os visitantes. No final da tarde (ca. 1800 h) a pétala estandarte começava a curvar-se em direção ao centro da flor e no dia seguinte todas as pétalas estavam fechadas, envolvendo o androceu,

enquanto a extremidade do estilete, crescida em relação ao dia anterior, permanecia descoberta.

Visitantes florais

Os polinizadores efetivos de diplóides e tetraplóides foram abelhas médias a grandes dos gêneros *Centris* e *Xylocopa* (Figs. 2C--D), e a abelha introduzida *Apis mellifera* (Tabela 2). Ao pousar na flor para beber néctar, essas abelhas tocavam nas anteras e no estigma com a região ventral do corpo, efetuando a polinização. Foram registradas visitas durante todo o período de antese floral. A abelha *Trigona spinipes* atuava ora como pilhadora de néctar, através da perfuração do cálice, sem contatar as partes reprodutivas da flor, ora como polinizadora ocasional, ao coletar pólen, contatando ocasionalmente o estigma. As abelhas *Frieseomelitta doederleini* e *Plebeia* sp. foram observadas coletando pólen, contatando ocasionalmente o estigma, sendo consideradas polinizadores ocasionais. Alguns beija-flores (Tabela 2) foram observados visitando as flores de *L. ferrea*, principalmente em indivíduos tetraplóides. Estes considerados polinizadores ocasionais, por serem menos frequentes do que as abelhas, por não serem observados em todos os indivíduos, pela menor proporção de flores visitadas por árvore devido ao comportamento agonístico entre eles, além de apresentarem contato apenas ocasional com as partes reprodutivas da flor.

Tanto em diplóides como em tetraplóides foi observada grande quantidade de flores com indícios de danos ou presença de florívoros que ainda poderiam danificar as estruturas reprodutivas. Na maioria dessas flores, os florívoros eram larvas de lepidópteros e sua alimentação muitas vezes consistia dos tecidos do ovário e óvulos, que eram parcial ou inteiramente destruídos. Como consequência dessa interação, muitas vespas foram vistas

inspecionando as flores por dentro e por fora, especialmente flores em pós-antese, na busca de larvas para se alimentar.

Sistema reprodutivo e isolamento entre os citótipos

Os indivíduos diplóides de *L. ferrea* não desenvolveram frutos após autopolinização, mas apresentaram elevado percentual de formação de frutos após polinização cruzada intraploidia (Tabela 3). Já os indivíduos tetraplóides apresentaram desenvolvimento de frutos após autopolinização (ambas as variedades *ferrea* e *glabrescens*) e, mesmo que esse valor tenha sido menor do que 2% (Tabela 3), quando comparado com a formação de frutos após polinização cruzada intraploidia, a qual também foi muito baixa (menor do que 4%) (Tabela 3), os valores dos dois tratamentos se aproximaram. É importante ressaltar que houve formação de frutos entre as variedades de tetraplóides analisadas. Assim, com relação ao sistema reprodutivo, os diplóides se mostraram autoincompatíveis e os tetraplóides foram considerados autocompatíveis (ver Índices de Autoincompatibilidade na Tabela 3). Já para os tratamentos de polinização cruzada interploidia os valores foram iguais, sem a formação de frutos por ambos os citótipos (Tabela 3).

Sucesso reprodutivo

Tanto diplóides como tetraplóides apresentaram baixa formação natural de frutos, inferior a 4% (Tabela 3). Porém, como os diplóides formaram muito mais frutos do que os tetraplóides no tratamento de polinização cruzada intraploidia (Tabela 3), a Eficácia Reprodutiva dos dois citótipos foi bastante diferente, com o valor 0,16 para os diplóides e 0,69 para os tetraplóides.

O número médio de sementes por fruto foi significativamente diferente entre os citótipos, com os diplóides apresentando valores maiores do que os tetraplóides ($4,41 \pm 1,37$ contra $3,19 \pm 1,23$ sementes por fruto, respectivamente; $t = 2,7059$; $p = 0,0108$). Na análise das sementes por categorias (íntactas, abortadas e predadas), houve diferença entre os citótipos ($F = 5,6296$; $p = 0,0112$) e entre as categorias ($F = 80,3921$; $p < 0,0001$). Apenas o número médio de sementes íntactas diferiu entre os citótipos, sendo maior nos diplóides do que nos tetraplóides ($p = 0,0027$). Entre as categorias, o número médio de sementes íntactas de diplóides e tetraplóides foi maior do que o de sementes abortadas de diplóides ($p = 0,0001$ e $p = 0,0001$, respectivamente) e tetraplóides ($p = 0,0001$ e $p = 0,0001$, respectivamente) e maior do que o número médio de sementes predadas de diplóides e tetraplóides ($p = 0,0001$) (Fig. 3). O Sucesso Reprodutivo Pré-emergente dos diplóides foi 2,5 vezes maior do que o dos tetraplóides (0,015 e 0,006, respectivamente).

Discussão

Os atributos florais de *L. ferrea*, como antese diurna, odor adocicado, flores amarelas, zigomorfas e com guia de néctar, indicam que a espécie é melitófila (*sensu* Faegri & Pijl 1979) e, de fato, seus polinizadores efetivos foram abelhas médias a grandes. Nesse aspecto, *L. ferrea* não contrasta com o padrão de Leguminosae ou de *Caesalpinia* s.l., gênero ao qual a espécie pertencia até recentemente. Ambos são amplamente melitófilos (Arroyo, 1981; Borges & al. 2009; Leite & Machado, 2009), ainda que tanto a família como o gênero apresentem vários exemplos de radiação adaptativa de suas síndromes florais, com espécies sendo polinizadas por aves, morcegos, borboletas e esfingídeos (Arroyo, 1981; Vogel, 1990; Lewis & al. 2000; Borges & al. 2009). Outra característica apresentada por *L. ferrea* e bastante difundida no gênero *Caesalpinia* é a variação no tamanho do pistilo em diferentes

flores do mesmo indivíduo, com várias espécies sendo consideradas andromonóicas (Borges & al., 2009). Em *C. calycina*, por exemplo, a maior parte das inflorescências analisadas por Lewis & Gibbs (1999) era constituída por flores hermafroditas na base e flores com ovário abortado ou pistilo reduzido no ápice do eixo. Para os autores, a função da andromonoiccia na espécie seria o incremento da função masculina.

Embora com tamanhos florais significativamente diferentes, indivíduos diplóides e tetraplóides apresentaram os mesmos polinizadores efetivos. Assim, no caso de populações mistas ou de populações de diplóides e tetraplóides contíguas, os visitantes florais podem, a princípio, promover um expressivo fluxo de pólen entre os citótipos. Essa transferência de pólen interploidia origina zigotos triplóides (inviáveis ou estéreis), e é desvantajosa principalmente para o citótipo em minoria (Levin, 1975). É possível que haja diferenças mais sutis na frequência relativa de cada polinizador, como foi observado entre citótipos diplóides e tetraplóides de *Heuchera grossulariifolia* (Segraves & Thompson, 1999), o que apenas uma análise detalhada de frequência poderia esclarecer. Essas diferenças poderiam contribuir para a separação de nicho reprodutivo entre os citótipos, contrabalançando os efeitos negativos da menor frequência do citótipo em minoria. Outra condição que poderia promover essa separação de nicho seria a deposição diferencial de pólen por diplóides e tetraplóides no corpo da abelha. De fato, houve diferença significativa entre o comprimento da plataforma de pouso nos dois citótipos, a qual foi ca. 15% maior nas flores de tetraplóides em relação às de diplóides (Tabela 1). É possível que essa diferença seja suficiente para diminuir a taxa de polinização entre os citótipos e, nesse caso, haveria a separação de nicho entre diplóides e tetraplóides de *L. ferrea*.

Em relação ao sistema reprodutivo, como afirmado anteriormente, houve diferença entre os citótipos, sendo os diplóides autoincompatíveis e os tetraplóides autocompatíveis. Essa diferença é mais um exemplo de uma das principais consequências da poliploidia: a

quebra da autoincompatibilidade (Levin, 2002), e tem grande importância para o estabelecimento e a dispersão dos poliplóides (Jackson, 1976). Possivelmente, é um dos integrantes do elenco de fatores que permitiram o sucesso dos tetraplóides de *L. ferrea*, uma vez que, mesmo após polinizações cruzadas, a formação de frutos é muito baixa, especialmente quando comparada com o valor encontrado para os diplóides.

Uma questão que merece destaque é o baixo sucesso reprodutivo da espécie, principalmente dos tetraplóides. Altas taxas de aborto de flores e frutos em condições naturais são um fenômeno bastante comum nas plantas e que atrai a atenção de pesquisadores há algum tempo (Bawa & Webb, 1984). Embora não tenhamos quantificado a extensão dos possíveis fatores responsáveis por essa característica em *Libidibia ferrea*, algumas inferências podem ser realizadas a respeito, sendo discutidas a seguir.

A floração em massa e com início ainda na estação seca torna as árvores de *L. ferrea* importantes fontes de recurso para os animais que se utilizam de suas flores. Dessa forma, as abelhas têm à disposição grande quantidade de néctar disponível em uma área relativamente próxima, como a copa de uma árvore e, assim, visitam várias flores do mesmo indivíduo, efetuando uma grande quantidade de autopolinizações. Para os diplóides, autoincompatíveis, isso é particularmente desvantajoso, e poderia estar refletido na baixa Eficácia Reprodutiva observada. Por outro lado, a baixa formação de frutos sob condições naturais observada também nos tetraplóides, que se mostraram autocompatíveis, exige uma explicação diferente. Além disso, este citótipo formou muito poucos frutos após polinizações cruzadas. Dessa forma, a carência de polinizações adequadas não pode ser considerada um fator significativo para o baixo sucesso reprodutivo da espécie, ao menos não para os dois citótipos. Essa foi a conclusão a que também chegaram Bawa & Webb (1984) quando descartaram essa hipótese para explicar o aborto de óvulos, pelo menos em quatro espécies de Leguminosae estudadas. Um fator que ocasionaria menor sucesso reprodutivo nos tetraplóides seria uma viabilidade de

gametas inferior, em decorrência da poliploidia. No entanto, como observado no presente trabalho, a viabilidade polínica foi alta e não diferiu entre os dois citótipos e, de fato, Beltrão & Guerra (1990) observaram meiose regular nos tetraplóides, o que implicaria em formação normal dos gametas.

A florivoria causada pelas larvas de lepidópteros, com danos principalmente para a função feminina das plantas, ocorre nos dois citótipos e pode ser um fator influente na alta taxa de aborto de flores observada na espécie. Essa possibilidade já foi inclusive considerada por Bawa & Webb (1984) como uma possível causa da produção excessiva de flores pelas plantas. Seria interessante investigar a proporção de flores afetadas, comparando-se os dois citótipos, além de avaliar a taxa de formação de frutos em flores com e sem florívoros.

A ausência de frutos após as polinizações cruzadas interploidia indica que não há fluxo gênico entre os dois citótipos ou, se houver, seus níveis são baixíssimos. Dessa forma, conclui-se que diplóides e tetraplóides de *L. ferrea* encontram-se reprodutivamente isolados. Essa afirmação, em conjunto com os outros achados discutidos anteriormente, tem importantes consequências para a ecologia e a taxonomia da espécie, bem como para planos de conservação e reflorestamento.

Primeiramente, é de se esperar que a exclusão do citótipo em minoria afete negativamente os tetraplóides em populações mistas de *L. ferrea*. Embora este citótipo tenha apresentado quebra na autoincompatibilidade, sua baixa formação de frutos após cruzamentos, a princípio compatíveis, constitui uma grande desvantagem em relação ao diplóide. Como não houve separação total de nicho reprodutivo, nos casos onde os dois citótipos ocorram em simpatria haverá o compartilhamento dos mesmos polinizadores. Assim, os argumentos para explicar o estabelecimento de tantas populações de tetraplóides precisam ser encontrados não na substituição de diplóides por tetraplóides, cuja análise domina o estudo de estabelecimento de poliplóides (ver Introdução), mas sim em mecanismos de

dispersão e colonização de novos habitats, como citado por Thompson & Lumaret (1992) e Fawcett e Van de Peer (2010). Estes últimos autores, inclusive, enfatizam a capacidade que muitos tetraplóides possuem de colonizar ambientes severos (“harsh environments”), onde seus progenitores diplóides não conseguem se estabelecer. Nesse contexto, é interessante observar a distribuição de *L. ferrea*: enquanto as populações diplóides ocorrem quase exclusivamente em florestas secas próximas do litoral ou em áreas de Caatinga com altitude mais elevada no interior do Estado, ambos com clima mais ameno, os tetraplóides ocorrem quase exclusivamente em áreas de Caatinga com condições climáticas mais severas (Beltrão & Guerra, 1990; dados não publicados). Nesses locais, há uma marcante sazonalidade, com uma estação seca muito intensa, o que faz com que quase toda a vegetação perca suas folhas (Queiroz, 2009). Devido aos frutos serem zoocóricos (observação pessoal, Borges L.A.), é possível que os tetraplóides rapidamente tenham conseguido estabelecer populações viáveis nesses locais, apesar do baixíssimo sucesso reprodutivo.

Com citótipos isolados reprodutivamente e apresentando grande variabilidade morfológica, atestada pela existência de quatro variedades na espécie, além dos resultados de morfometria floral aqui apresentados, torna-se urgente uma revisão dos limites de *Libidibia ferrea* e a proposição de novos táxons, mais condizentes com a realidade biológica da espécie. Como revisado por Soltis & al. (2007), são raros os casos em que autopoliplóides foram considerados espécies distintas de seus progenitores diplóides. No entanto, os autores defendem uma mudança nessa tradição, uma vez que ela não retrata bem a variedade de entidades biológicas existentes na natureza. Ainda de acordo com os autores, a questão não é nomear todos os autopoliplóides, mas sim analisá-los cuidadosamente antes de considerá-los meros citótipos, pois, muitas vezes, eles preenchem os requerimentos de múltiplos conceitos de espécie. Uma importante contribuição do presente estudo para o início dessa tarefa foi dada com a comprovação de que diplóides e tetraplóides de *L. ferrea* estão isolados

reprodutivamente e que diferem com relação à morfometria floral, sendo possível encontrar caracteres morfológicos diagnósticos para os dois citótipos.

Por fim, vale ressaltar a importância que esse conhecimento tem para planos de conservação. Embora *L. ferrea* não seja ameaçada de extinção, sua utilização em projetos de reflorestamento, como o que atualmente está sendo executado nas margens do Rio São Francisco, precisa ser cautelosamente executada. Se matrizes diplóides e tetraplóides forem utilizadas indiscriminadamente para produção de mudas a serem plantadas nos mesmos locais, é possível criar situações inadequadas para a recuperação das áreas. As populações artificiais poderão enfrentar desequilíbrios causados pela diminuição do sucesso reprodutivo, já baixo, causada por cruzamentos entre os diferentes citótipos ou, havendo diferenças fisiológicas e ecológicas que favoreçam o estabelecimento de apenas um citótipo, várias mudas irão perecer por não conseguirem se estabelecer sob aquelas condições, diminuindo o tamanho efetivo da população.

Agradecimentos

À Senhora Dodôri, Seu Antônio e Seu Edísio, pela permissão para realização do estudo em suas propriedades; a G. Jones, K. Demétrio e S. Soares, pela ajuda no trabalho de campo; A. E. Ribeiro e R. Pires, pela ajuda no trabalho de laboratório; A. D. Coelho, pela identificação das abelhas; A. M. Meiado, pelo auxílio com as análises estatísticas; À CAPES, pela bolsa de doutorado concedida a L. Souza; Ao CNPq, pela bolsa de doutorado concedida a L. Borges e pelas bolsas de produtividade em pesquisa concedidas a I. Machado, M. Guerra e A. Lopes, além do apoio financeiro a projeto de pesquisa coordenado por A. Lopes (Processo CNPq nº 567739/2008-2).

Literatura Citada

- Alexander, M.P.** 1980. A versatile stain for pollen, fungi, yeast, and bacteria. *Stain Technology* 55: 13--18.
- Araújo-Filho, J.C., Burgos, N., Lopes, O.F., Silva, F.H.B.B., Medeiros, L.A.R., Melo-Filho, H.F.R., Parahyba, R.B.V., Cavalcanti, A.C., Oliveira-Neto, M.B., Silva, F.B.R., Leite, A.P., Santos, J.C.P., Sousa-Neto, N.C., Silva, A.B., Luz, L.R.Q.P., Lima, P.C., Reis, R.M.G. & Barros, A.H.C.** 2000. *Levantamento de Reconhecimento de Baixa e Média Intensidade dos Solos do Estado de Pernambuco*. Boletim de Pesquisa 11. Embrapa Solos, Rio de Janeiro.
- Arroyo, M.T.K.** 1981. Breeding systems and pollination biology in Leguminosae. Pp.723--769 in: Polhill, R.M., Raven, P.H. (eds.), *Advances in Legume Systematics, Part2*. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Barringer, B.C.** 2007. Polyploidy and self-fertilization in flowering plants. *American Journal of Botany* 94: 1527--1533.
- Barros e Silva, A.E. & Guerra, M.** 2010. The meaning of DAPI bands observed after C-banding and FISH procedures. *Biotechnic & Histochemistry* 85: 115--125.
- Bawa, K.S. & Webb, C.J.** 1984. Flower, fruit and seed abortion in tropical forest trees: implications for the evolution of paternal and maternal reproductive patterns. *American Journal of Botany* 71: 736--751.
- Beltrão, G.T.A. & Guerra, M.** 1990. Citogenética de angiospermas coletadas em Pernambuco – III. *Ciência e Cultura* 42: 839--845.
- Borges, L.A. Sobrinho, M.S. & Lopes, A.V.** 2009. Phenology, pollination, and breeding system of the threatened tree *Caesalpinia echinata* Lam. (Fabaceae), and a review of studies on the reproductive biology in the genus. *Flora* 204: 111--130.

- Cruden, R.W.** 1977. Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution* 31: 32--46.
- Faegri, K. & Pijl, L.** 1979. *The Principles of Pollination Ecology*. Pergamon Press, London.
- Fawcett, J.A. & Van de Peer, Y.** 2010. Angiosperm polyploids and their road to evolutionary success. *Trends in Evolutionary Biology* 2: 16--21.
- Felber, F.** 1991. Establishment of a tetraploid cytotype in a diploid population: Effect of relative fitness of the cytotypes. *Journal of Evolutionary Biology* 4: 195--207.
- Fowler, N.L. & Levin, D.A.** 1984. Ecological constraints on the establishment of a novel polyploid in competition with its diploid progenitor. *The American Naturalist* 124: 703--711.
- Guerra, M.** 2008. Chromosome numbers in plant cytogenetics: concepts and implications. *Cytogenetic and Genome Research* 120: 339--350.
- Husband, B.C.** 2000. Constraints on Polyploid Evolution: A Test of the Minority Cytotype Exclusion Principle. *Proceedings of the Royal Society of London, B* 267: 217--223.
- Husband, B.C. & Schemske, D.W.** 2000. Ecological mechanisms of reproductive isolation between diploid and tetraploid *Chamerion angustifolium*. *Journal of Ecology* 88: 689--701.
- Husband, B.C., Ozimec, B., Martin, S.L. & Pollock, L.** 2008. Mating consequences of polyploid evolution in flowering plants: current trends and insights from synthetic polyploids. *International Journal of Plant Sciences* 169: 195--206.
- Jackson, R.C.** 1976. Evolution and systematic significance of polyploidy. *Annual Review of Ecology and Systematics* 7: 209--234.
- LAMEPE (Laboratório de Meteorologia de Pernambuco).** 2010. Dados de chuvas e temperaturas por município. Disponível em: <http://www.itep.br/LAMEPE.asp> Acesso em 19/06/2010.

- Leite, A.V. & Machado, I.C.** 2009. Biologia reprodutiva da “catingueira” (*Caesalpinia pyramidalis* Tul., Leguminosae-Caesalpinioideae), uma espécie endêmica da Caatinga. *Revista Brasileira de Botânica* 32: 79--88.
- Levin, D.A.** 1975. Minority Cytotype Exclusion in Local Plant Populations. *Taxon* 24: 35--43.
- Levin, D.A.** 1983. Polyploidy and novelty in flowering plants. *The American Naturalist* 122: 1--25.
- Levin, D.A.** 2002. *The Role of Chromosomal Change in Plant Evolution*. Oxford University Press, Oxford.
- Lewis, G.P.** 2005. Caesalpinieae. Pp.127--161 in Lewis, G., Schrire, B., MacKinder, B. & Lock, M. (eds.), *Legumes of the World*. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Lewis, G. & Gibbs, E.** 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., Simpson, B.B. & Neff, J.L.** 2000. Progress in understanding the reproductive biology of the Caesalpinioideae (Leguminosae). Pp. 65--78 in Herendeen, P.S., Bruneau, A. (eds.), *Advances in Legume Systematics, vol.9*. Royal Botanic Garden, Kew.
- Martin, F.M.** 1959. Staining and observing pollen in the style by means of fluorescence. *Stain Technology* 34: 125--128.
- Masterson, J.** 1994. Stomatal Size in Fossil Plants: Evidence for Polyploidy in Majority of Angiosperms. *Science* 264: 421-- 24.
- Miller, J.S. & Venable, D.L.** 2000. Polyploidy and the Evolution of Gender Dimorphism in Plants. *Science* 289: 2335--2338.
- Queiroz, L.P.** 2009. *Leguminosas da Caatinga*. Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.

- Ramsey J. & Schemske D.W.** 1998. Pathways, mechanisms, and rates of polyploidy formation in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29: 467--501.
- Rizzini C.T. & Mattos-Filho A.** 1968. Espécies Novas da Flora Brasileira. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 40: 231--235.
- Rodríguez, D.J.** 1996. A model for the establishment of polyploidy in plants. *The American Naturalist* 147: 33--46.
- Segraves, K.A. & Thompson, J.N.** 1999. Plant polyploidy and pollination: floral traits and insect visits to diploid and tetraploid *Heuchera grossulariifolia*. *Evolution* 53: 1114--1127.
- Sokal, R.R. & Rohlf, F.J.** 1995. *Biometry – The principles and practice of statistics in biological research*. W. H. Freeman and Company, New York.
- Soltis, D.E., Soltis, P.S., Schemske, D.W., Hancock, J.F., Thompson, J.N., Husband, B.C. & Judd, W.S.** 2007. Autopolyploidy in angiosperms: have we grossly underestimated the number of species? *Taxon* 56: 13--30.
- Stebbins, G.L.** 1940. The Significance of Polyploidy in Plant Evolution. *The American Naturalist* 74: 54--66.
- Thompson, J.D. & Lumaret, R.** 1992. The Evolutionary Dynamics of Polyploid Plants: Origins, Establishment, and Persistence. *Trends in Ecology and Evolution* 7: 302--307.
- Vogel, S.** 1990. Radiación adaptativa del síndrome floral en las familias neotropicales. *Boletín de la Academia Nacional de Ciencias. Córdoba* 59: 5--30.
- Wiens, D., Calvin, C.L., Wilson, C.A., Davern, C.I., Frank, D. & Seavey, S.R.** 1987. Reproductive success, spontaneous embryo abortion, and genetic load in flowering plants. *Oecologia* 71: 501--509.
- Zapata, T.R. & Arroyo, M.T.K.** 1978. Plant reproductive ecology of a secondary deciduous tropical forest in Venezuela. *Biotropica* 10: 221--230.

Tabela 1. Morfometria floral (média \pm DP) de citótipos diplóides e tetraplóides de *Libidibia ferrea* (Leguminosae - Caesalpinioideae) ocorrentes em Pernambuco, Brasil. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa.

Parâmetro (mm)	Diplóides (média \pm DP)	Tetraplóides (média \pm DP)	t e p
Corola			
Comprimento horizontal	12,76 \pm 1,03 a	16,91 \pm 0,62 b	t = -7,6905; p = 0,0001
Comprimento vertical	10,65 \pm 1,33 a	13,95 \pm 0,94 b	t = -4,5056; p = 0,0019
Ovário			
Comprimento	3,04 \pm 0,29 a	4,60 \pm 0,65 b	t = -4,8941; p = 0,0012
Diâmetro	1,06 \pm 0,09 a	1,44 \pm 0,23 b	t = -3,4403; p = 0,0088
Número de óvulos	7,40 \pm 0,55 a	10,00 \pm 0,71 b	t = -6,5; p = 0,0002
Estilete			
Comprimento	6,40 \pm 0,55 a	8,42 \pm 1,18 b	t = -3,4775; p = 0,0083
Diâmetro	0,44 \pm 0,05 a	0,52 \pm 0,04 b	t = -2,5298; p = 0,0353
Estames			
Comprimento	8,13 \pm 0,47 a	10,3 \pm 0,82 b	t = -7,3564; p < 0,0001
Plataforma de pouso*			
Comprimento	7,60 \pm 0,62 a	8,97 \pm 0,30 b	t = - 4,4004; p = 0,0023

* Comprimento parcial do conjunto de estames e pistilo, medido do ápice das anteras e estigma até a pétala estandarte, o que corresponde à plataforma de pouso das abelhas durante a visita.

Tabela 2. Visitantes florais de indivíduos diplóides e tetraplóides de *Libidibia ferrea* (Leguminosae - Caesalpinioideae) ocorrentes em Pernambuco, Brasil.

Espécie	Recurso coletado	Comportamento
Abelhas		
Hymenoptera – Apidae		
<i>Apis mellifera</i> Linnaeus, 1758	Néctar	Polinizador efetivo
<i>Centris aenea</i> Lepeletier, 1841	Néctar	Polinizador efetivo
<i>C. fuscata</i> Lepeletier, 1841	Néctar	Polinizador efetivo
<i>Frieseomelitta doederleini</i> (Friese, 1900)	Pólen	Polinizador ocasional
<i>Plebeia</i> sp.	Pólen	Polinizador ocasional
<i>Trigona spinipes</i> (Fabricius, 1793)	Néctar / Pólen	Pilhador / polinizador ocasional
<i>Xylocopa frontalis</i> (Olivier, 1789)	Néctar	Polinizador efetivo
<i>Xylocopa grisescens</i> Lepeletier, 1841	Néctar	Polinizador efetivo
Beija-flores		
Apodiformes – Trochilidae		
<i>Chlorostilbon lucidus</i> (Shaw, 1812)	Néctar	Polinizador ocasional
<i>Eupetomena macroura</i> (Gmelin, 1788)	Néctar	Polinizador ocasional

Tabela 3. Resultados dos tratamentos de polinização controlada e natural e Índice de Autoincompatibilidade (modificado de Zapata & Arroyo, 1978) em indivíduos diplóides e tetraplóides de *Libidibia ferrea* (Leguminosae - Caesalpinioideae) ocorrentes em Pernambuco, Brasil.

Tratamento	Diplóides		Tetraplóides	
	Flores (<i>N</i>)	Frutos (<i>N</i>) / Sucesso	Flores (<i>N</i>)	Frutos (<i>N</i>) / Sucesso
Autopolinização	50	0	110	2 / 1,81%
Polinização cruzada intraploidia	60	12 / 20%	141	7 / 3,86%
Polinização cruzada interploidia	60	0	60	0
Polinizações naturais	150	5 / 3,3%	150	4 / 2,7%
Índice de Autoincompatibilidade		0		0,47

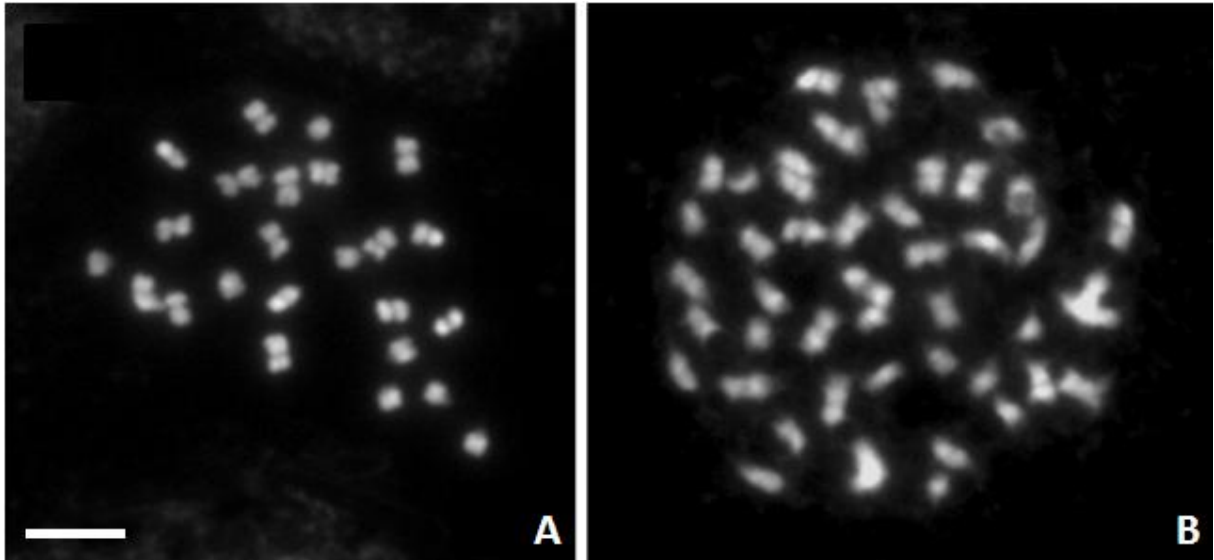


Fig. 1. Metáfases em citótipos diplóide (A) e tetraplóide (B) de *Libidibia ferrea* (Leguminosae - Caesalpinioideae). (Barra = 5 μ m).



Fig. 2. Flor de indivíduo diplóide (A) e tetraplóide (B) de *Libidibia ferrea* (Leguminosae - Caesalpinioideae) ocorrentes em Pernambuco, Brasil; *Xylocopa frontalis* (C) e *Xylocopa grisescens* (D) polinizando flores de indivíduo tetraplóide (Barra = 0,5 cm).

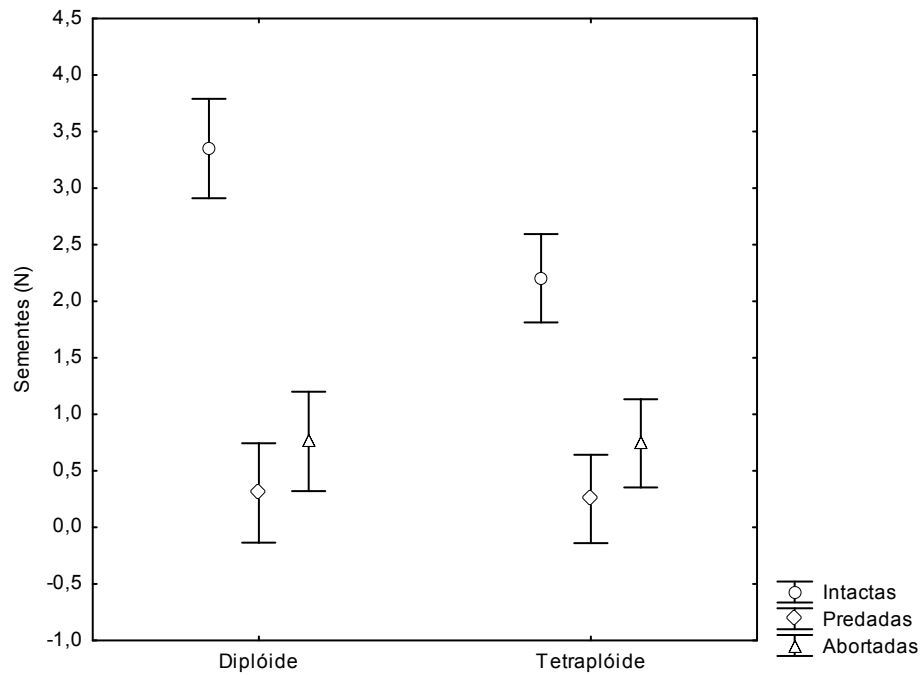


Fig. 3. Número médio de sementes intactas, predadas e abortadas por fruto em indivíduos diplóides e tetraplóides de *Libidibia ferrea* ocorrentes no Estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil.

CAPÍTULO TRÊS

**BIOLOGIA REPRODUTIVA DE *SENNA MACRANTHERA* (COLLAD.)
H.S. IRWIN & BARNEBY (LEGUMINOSAE – CAESALPINIOIDEAE)**

*MANUSCRITO A SER ENVIADO AO PERIÓDICO
PLANT SPECIES BIOLOGY*

**Biologia reprodutiva de *Senna macranthera* (Collad.) H.S. Irwin & Barneby
(Legumionosae – Caesalpinioideae)**

Laís Angélica Borges^a, Isabel Cristina Machado^b, Ariadna Valentina Lopes^{b*}

^a Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Departamento de Botânica, CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Prof. Nelson Chaves, s/nº, Cidade Universitária, 50372-970, Recife, PE, Brasil

^b Departamento de Botânica, CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Prof. Nelson Chaves, s/nº, Cidade Universitária, 50372-970, Recife, PE, Brasil

* Autor para correspondência. *E-mail*: avflop@ufpe.br, ariadna.lopes@pq.cnpq.br

Título abreviado: Biologia reprodutiva de *Senna macranthera*

Resumo

Espécies com flores de pólen constituem um importante grupo funcional de angiospermas, provendo alimento para diversos tipos de insetos. Dentro desse grupo de plantas destaca-se o gênero *Senna* (Leguminosae), com flores altamente especializadas para a coleta de pólen por vibração, realizada exclusivamente por abelhas. O objetivo do presente trabalho foi investigar a biologia floral, a ecologia da polinização e o sistema reprodutivo de *Senna macranthera* var. *pudivunda* (Benth.) H.S. Irwin & Barneby, variedade endêmica da Caatinga, uma floresta seca do nordeste do Brasil. O estudo foi realizado em 2009 em uma área de Caatinga no município de Serra Talhada, Pernambuco. As flores de *S. macranthera* são amarelas, assimétricas, enantiofilas e o androceu é formado por três estaminódios adaxiais e sete estames férteis: quatro intermediários pequenos e um abaxial com filete delgado, médio e colateral ao pistilo, todos portando as anteras de alimentação, e dois abaxiais maiores, com filetes delgados e comprimentos diferentes, opostos ao pistilo e portando as anteras de fertilização. Não houve diferença na coloração do citoplasma e no tamanho dos grãos de pólen entre as diferentes anteras. A antese é diurna e dura dois dias. Os polinizadores efetivos foram abelhas grandes dos gêneros *Eulaema* e *Xylocopa*, enquanto as abelhas pequenas *Exomalopsis analis*, *Augochlora esox*, *Pseudaugochlora pandora* e *Trigona spinipes* foram consideradas pilhadoras, esta última coletando pólen através da perfuração das anteras com as mandíbulas, enquanto as outras coletaram pólen através de vibração. *Senna macranthera* var. *pudivunda* é autoincompatível, com Índice de Autoincompatibilidade de 0,042, e a formação natural de frutos (16,7%) foi bem mais baixa que a das polinizações cruzadas manuais (68,6%). A espécie apresentou atributos da morfologia floral típicos do gênero e da subtribo, a maioria relacionada com a polinização por vibração que ocorre no

grupo. Essa forma relativamente especializada de melitofilia depende de abelhas generalistas, como também foi encontrado no presente estudo.

Palavras-chave: abelhas, autoincompatibilidade, enantiostilia, heteranteria, polinização por ricochete, polinização por vibração.

Introdução

Plantas com flores de pólen, como são conhecidas as flores que não ofertam nenhum outro recurso aos polinizadores (*sensu* Vogel 1978), constituem um importante grupo funcional dentro das angiospermas, provendo alimento principalmente para abelhas, besouros e moscas, e ocorrendo em várias famílias de ordens filogeneticamente distantes (ver Vogel 1978 e Buchmann 1983). Baseado na origem dos grupos, no número de estames, na forma de apresentação do pólen e nos principais polinizadores, Vogel (1978) reconheceu três categorias de flores de pólen: os tipos *Magnolia*, *Papaver* e *Solanum*, sendo o primeiro o mais antigo, precedendo as flores de néctar, e o último o mais recente na evolução das angiospermas. Os tipos *Magnolia* e *Papaver* apresentam androceu polistêmone e são polinizados principalmente por besouros e abelhas, respectivamente, enquanto o tipo *Solanum* é oligostêmone e exclusivamente melitófilo (Vogel 1978).

Dentro desta última categoria encontra-se a subtribo Cassiinae (Leguminosae-Caesalpinioideae), com 660 espécies, distribuídas nos gêneros *Cassia*, *Senna* e *Chamaecrista* (Irwin & Barneby 1982, Lewis 2005). O grupo, essencialmente tropical, apresenta distribuição cosmopolita, porém a maioria de suas espécies (c. 80%) é nativa do continente americano (Lewis 2005). Com relação à reprodução, à exceção de algumas espécies de *Senna* e *Chamaecrista* que desenvolveram certo grau de cleistogamia (Irwin & Barneby 1982), o grupo é exclusivamente dependente de abelhas fêmeas que coletam pólen através de vibração para alimentar suas larvas (Gottsberger & Silberbauer-Gottsberger 1988). Algumas características relacionadas às flores de pólen do tipo *Solanum*, como anteras porcidas, heteranteria e enantiostilia (Vogel 1978), encontram-se presentes e diversamente desenvolvidas em muitas de suas espécies (Gottsberger & Silberbauer-Gottsberger 1988).

Com morfologia floral e mecanismos de polinização bastante elaborados e intrigantes, a subtribo Cassiinae atrai a atenção de pesquisadores, interessados especialmente em elucidar as interações planta-polinizador (e.g. Dulberger 1981, Gottsberger & Silberbauer-Gottsberger 1988, Westerkamp 2004). O gênero *Senna* Mill. é particularmente interessante para esse tipo de estudo, por apresentar espécies com flores assimétricas e espécies com flores zigomorfas, provocadas pela presença ou ausência de enantiostilia e pela alta variação no androceu e nas pétalas (Marazzi & Endress 2008). Apesar de investigações detalhadas com relação aos padrões de (as)simetria floral (c.f. Marazzi & Endress 2008) e à diversidade de anteras e estigmas (c.f. Marazzi *et al.* 2007) no gênero, além de descrições da polinização de algumas espécies (basicamente todos os estudos citados anteriormente para a subtribo e os estudos de caso citados a seguir), apenas dez de suas 300 espécies foram analisadas quanto ao sistema reprodutivo: *S. acclinis* (Williams 1998), *S. aphylla* (Simpson 1977), *S. artemisioides* (Randell, 1970), *S. australis* (Silva *et al.* 2002), *S. corymbosa* (Laporta 2005), *S. didymobotrya* (Dulberger 1981), *S. martiana* e *S. spectabilis* (Leite & Machado 2010), *S. multijuga* (Wolowski & Freitas 2010) e *S. sylvestris* (Carvalho & Oliveira 2003), o que corresponde a 3,3% de suas espécies.

O gênero apresenta o mesmo padrão de distribuição da subtribo, ou seja, é pantropical, mas com maior riqueza no continente americano, especialmente em áreas sazonais, muitas vezes áridas ou semiáridas (Lewis 2005). Na Caatinga, uma formação florestal de porte baixo inserida no semiárido brasileiro e com características xeromorfas, como deciduidade, microfilia, acúleos e espinhos, as espécies de *Senna* estão entre as plantas mais conspícuas e as que mais contribuem para a paisagem do ecossistema (Queiroz 2009).

Dentre as 22 espécies do gênero registradas para a Caatinga está *Senna macranthera* (Collad.) H.S. Irwin & Barneby, um arbusto a arvoreta que ocorre em diversos habitats na América do Sul e apresenta grande polimorfismo, razão pela qual são reconhecidas oito

variedades, das quais três ocorrem na Caatinga: *Senna macranthera* var. *micans*, *S. macranthera* var. *pudibunda* e *S. macranthera* var. *striata* (Irwin & Barneby 1982, Queiroz 2009). *Senna macranthera* var. *pudibunda* (Benth.) H.S. Irwin & Barneby, popularmente conhecida como são-joão (Queiroz 2009) ou pau de besouro, é um arbusto endêmico da Caatinga, ocorrendo do Piauí, Ceará e Rio Grande do Norte à Bahia (Irwin & Barneby 1982), em altitudes de 400 a 850 m (Queiroz 2009). Assim, o objetivo do presente trabalho foi investigar a biologia floral, a ecologia da polinização e o sistema reprodutivo desta variedade.

Material e Métodos

Local do estudo

O estudo foi realizado em 2009 na Estação Experimental de Serra Talhada do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) (07°56'37.0''S, 38°17'42.3''O), localizada no município de Serra Talhada, Pernambuco, Nordeste do Brasil. A área encontra-se a 430 km do litoral e a cerca de 500 m de altitude. A precipitação e a temperatura médias anuais são de 679 mm e 24,8 °C, respectivamente, sendo as chuvas fortemente sazonais, o que provoca a ocorrência de uma estação chuvosa, geralmente de quatro a cinco meses, entre janeiro e maio, e uma seca, de sete a oito meses, de junho a dezembro (Ferraz *et al.* 2003). O local apresenta vegetação típica de Caatinga, com alta densidade de indivíduos, altura média e máxima de 4 m e 23 m, respectivamente, e Euphorbiaceae, Leguminosae e Anacardiaceae são as principais famílias (Ferraz *et al.* 2003).

Apesar de *Senna macranthera* var. *pudibunda* ser encontrada em áreas preservadas da estação, a quantidade de indivíduos foi perceptivelmente maior em locais degradados, como beiras de estradas, pastos e plantações. A espécie apresenta indivíduos isolados, porém ocorre

mais frequentemente em aglomerados. Ao todo, dez indivíduos de diferentes aglomerados foram utilizados nas observações e análises, descritas a seguir.

Biologia Floral e Ecologia da Polinização

A morfologia e a antese floral de *S. macranthera* var. *pubibunda* (de agora em diante referida como *S. macranthera*) foram analisadas em maio e junho de 2009 através da marcação de botões florais em pré-antese e observação das modificações nas partes florais até o início da queda das pétalas. Para a detecção de áreas absorvedoras de luz ultravioleta, algumas flores intactas foram submetidas a teste com hidróxido de amônio (NH₄OH), o qual reage com pigmentos flavonóides que absorvem luz UV (Scogin *et al.* 1977). Para avaliar possíveis diferenças entre o pólen das anteras de alimentação e o das anteras de fertilização foram avaliadas a viabilidade polínica e o tamanho dos grãos das anteras de três botões florais fixados em álcool 70%. A viabilidade foi checada indiretamente através de coloração do citoplasma com carmim acético (Radford *et al.*) (N = 200 grãos por lâmina) e o diâmetro equatorial dos grãos foi medido com ocular micrométrica (N = 10 grãos por lâmina).

Os visitantes florais foram observados em dez indivíduos, durante três dias em maio e três dias em junho de 2009, totalizando ca. 60 horas de observação e, de acordo com o tamanho e o comportamento de visita, foram classificados em: 1) polinizadores, quando coletavam pólen e, ao chegar ou sair da flor, ou mesmo durante a vibração, tocavam o estigma com a região dorsal do corpo, e 2) pilhadores, quando coletavam pólen e, devido a seu pequeno tamanho, não tocavam o estigma. Espécimes foram coletados para posterior identificação, tendo sido depositados como material testemunho na coleção entomológica do Laboratório de Biologia Floral e Reprodutiva da Universidade Federal de Pernambuco.

Sempre que possível foram feitos registros fotográficos para documentar o estudo e auxiliar na descrição do comportamento de visita.

Sistema e Sucesso Reprodutivos

Para avaliação do sistema reprodutivo foram realizados tratamentos de polinização controlada em sete indivíduos, cada um distando pelo menos 50 m do indivíduo mais próximo, com exceção de duas plantas, que se localizavam a cerca de 5 m uma da outra. Para cada indivíduo, 10 flores foram utilizadas para autopolinizações manuais e 10 para polinizações cruzadas manuais. Nos cruzamentos, cinco doadores diferentes de pólen foram empregados por planta-mãe (duas flores da planta-mãe por doador). As flores utilizadas como fonte de pólen eram isoladas em pré-antese e, quando recém abertas, apenas o pólen das duas anteras abaxiais opostas ao pistilo (anteras de fertilização) era empregado, tanto nos cruzamentos, como nas autopolinizações (geitonogamia). Todas as polinizações foram realizadas no primeiro dia de antese de flores previamente isoladas em estágio de botão com sacos semipermeáveis. As flores permaneceram encobertas por pelo menos três dias após os tratamentos de polinização e foram acompanhadas diariamente para a análise do percentual de formação de frutos e do tempo de aborto em cada tratamento. Com os valores encontrados, foi calculado o Índice de Autoincompatibilidade (IAI) (razão entre a porcentagem de frutos formados por autopolinização manual e a de frutos formados por polinização cruzada manual; modificado de Zapata & Arroyo, 1978), onde um valor de até 0,2 indica uma espécie autoincompatível, enquanto um valor acima de 0,2 indica uma espécie autocompatível.

A formação natural de frutos foi acompanhada em três indivíduos, utilizando 30 flores para cada um, marcadas em dias diferentes (10 flores por dia, durante três dias) e observadas em oito, 15, 27 e 41 dias após a marcação. Os dados foram utilizados no cálculo da Eficácia

Reprodutiva (razão entre a porcentagem de frutos formados sob condições naturais e a de frutos formados por polinização cruzada manual) (Zapata & Arroyo 1978).

Resultados

Biologia Floral e Ecologia da Polinização

As flores de *Senna macranthera* são pediceladas e estão dispostas em amplas panículas terminais. O cálice, dialissépalo e verde-claro, e a corola, dialipétala e amarela, são pentâmeros e assimétricos (Fig. 1A). Uma das pétalas laterais inferiores é côncava, circundando os dois estames maiores, opostos ao pistilo (Fig. 1A). O androceu é constituído por três estaminódios adaxiais e sete estames com anteras poricidas: quatro intermediários pequenos, com filetes robustos, e um abaxial com filete delgado e médio, deslocado para o lado do eixo central da flor e colateral ao pistilo, todos portando as anteras de alimentação, e dois estames abaxiais maiores, com filetes delgados e de comprimentos diferentes, também deslocados, mas para o lado oposto ao do pistilo, portando as anteras de fertilização ou polinização (Figs. 1A, B). O ovário é súpero, monocarpelar e o pistilo é curvado para o lado direito ou esquerdo, caracterizando enantioestilia. Como o mesmo indivíduo apresenta inflorescências com os dois morfos florais, a enantioestilia de *S. macranthera* é monomórfica (*sensu* Barrett *et al.* 2000) e uma vez que há anteras diferenciadas e duas delas são opostas ao pistilo, a espécie apresenta enantioestilia recíproca (*sensu* Jesson & Barrett 2003).

As flores ofertam apenas pólen e não produzem odor perceptível. As anteras apresentaram reação positiva ao teste com hidróxido de amônio, indicando a existência de áreas absorvedoras de luz UV: enquanto a metade superior permaneceu com a mesma coloração, a metade inferior se mostrou escurecida, marrom-clara (Fig. 1B). Além disso, o

ápice das anteras, o contorno das aberturas dos poros, as linhas de contorno entre os sacos polínicos (estômio) e a linha de contorno entre as tecas adquiriram coloração castanha (Fig. 1B), indicando a presença de pigmentos flavonóides também nessas áreas.

Os grãos de pólen das anteras de alimentação e de fertilização apresentaram o mesmo tamanho e a mesma coloração com carmim acético apresentando, portanto, valores similares de viabilidade polínica. O pólen das anteras de alimentação apresentou diâmetro médio de $32,24 \pm 0,88 \mu\text{m}$ e viabilidade de $96,9 \pm 0,98\%$, enquanto o pólen das anteras de fertilização apresentou diâmetro médio de $31,97 \pm 0,56 \mu\text{m}$ e viabilidade de $96,7 \pm 1,18\%$.

As flores abrem no início da manhã e as pétalas permanecem distendidas por toda a antese, que dura dois dias. A única diferença perceptível entre as flores do primeiro e as do segundo dia é a coloração das anteras, amarelo-claro no primeiro, com as linhas dos estômios e entre as tecas amarelo-esverdeadas, e bege no segundo dia, com as linhas castanhas (Figs. 1A, D). No terceiro dia, as pétalas se mostram desbotadas e começam a se desprender. Nos dias seguintes, além das pétalas, o androceu também começa a soltar-se, iniciando pelos estames de fertilização.

Os polinizadores efetivos de *S. macranthera* foram abelhas grandes dos gêneros *Eulaema* e *Xylocopa* (Tabela 1 e Fig. 1C). Ao pousarem na flor, essas abelhas agarram-se aos quatro estames pequenos de alimentação, vibram os músculos indiretos de vôo (ver Buchmann 1983) e com isso provocam a liberação de pólen de todas as anteras da flor. Enquanto o pólen das cinco anteras de alimentação é lançado para o ventre das abelhas, o pólen das anteras reprodutivas, opostas ao pistilo, é lançado em direção à pétala curvada que os envolve, onde é rebatido e lançado de volta, sendo depositado no dorso lateral da abelha (polinização por ricochete, *sensu* Westerkamp 2004) (Fig. 1C). Ao visitar flores de diferentes morfos, ambos os lados direito e esquerdo do dorso da abelha ficam cobertos de pólen. A polinização ocorre quando, no momento da visita, o estigma toca um dos lados da abelha

(esquerdo ou direito, dependendo do morfo floral), recebendo grãos de pólen previamente lançados aí por visitas a outras flores, da mesma planta ou de plantas diferentes. Após a coleta, durante o vôo, as abelhas transferem o pólen depositado na região ventral para as escopas, mas o pólen presente na região dorsal não é alcançado por suas pernas, permanecendo disponível para a polinização de outras flores.

As abelhas *Exomalopsis analis* (Fig. 1D), *Augochlora esox* e *Pseudaugochlora pandora* foram observadas coletando pólen por vibração, porém, devido ao pequeno tamanho do corpo em relação ao tamanho das flores, essas espécies dificilmente contatam o estigma, sendo então consideradas pilhadoras. *Trigona spinipes* também foi observada coletando pólen (Fig. 1E), mas, uma vez que essas abelhas não apresentam a habilidade de vibrar o corpo, a coleta se deu através da perfuração das anteras com as mandíbulas. Também devido ao pequeno tamanho corporal e à baixa probabilidade de contato com o estigma, foi considerada pilhadora. Além disso, algumas vezes essa espécie afugentou abelhas maiores que tentavam se aproximar das flores.

Apesar de *Senna macranthera* ser polinizada exclusivamente por abelhas, diversos outros insetos foram observados alimentando-se de suas estruturas florais, incluindo pétalas, estames, anteras e pistilo. Assim, a espécie apresentou altas taxas de florivoria, provocada por besouros, ortópteros e larvas de lepidópteros, entre outros.

Sistema e Sucesso Reprodutivos

Senna macranthera apresentou quase 70% de formação de frutos maduros após polinizações cruzadas e menos de 3% após autopolinizações (Tabela 2), gerando um Índice de Autoincompatibilidade de 0,042. Todas as plantas testadas amadureceram frutos após polinizações cruzadas, enquanto apenas uma amadureceu os dois únicos frutos provenientes

de autopolinização. Esse mesmo indivíduo foi o que apresentou a menor formação de frutos por polinização cruzada (20%), ao passo que todos os outros amadureceram de 60 a 90% dos frutos nesse tratamento.

As taxas de aborto de flores e frutos imaturos dos diversos tratamentos de polinização estão representadas na Fig. 2. Observa-se que mais de 75% das flores autopolinizadas caíram até oito dias após a realização dos testes, contra menos de 16% das flores de polinização cruzada. No entanto, apesar de haver uma grande diferença na quantidade final de flores e frutos abortados entre os tratamentos de autopolinização e os de polinização cruzada, ambos apresentaram semelhança na taxa relativa de aborto, isto é, a taxa de flores abortadas em relação ao número total de abortos de cada tratamento. Assim, do total de flores abortadas nos dois tratamentos, cerca de 50% caiu até seis dias após a antese e 90% até quinze dias (Fig. 2).

A formação de frutos sob condições naturais foi bem mais baixa que a de polinizações cruzadas manuais (Tabela 2) e o índice de Eficácia Reprodutiva foi de 0,24. Mais da metade das flores acompanhadas para formação natural de frutos caiu até oito dias após as marcações (Fig. 2) e cerca de 20% caiu na segunda semana. A taxa de aborto relativa foi de 68% até oito dias e de 95% até 15 dias após a marcação.

Três indivíduos sofreram predação parcial ou total de frutos imaturos dos tratamentos de polinização controlada, num total de 13 frutos, dos quais apenas três chegaram à maturidade. O restante caiu até cinco dias após os danos. Uma das plantas apresentou 70% dos frutos de polinização cruzada com algum dano, dos quais apenas um amadureceu. Essa mesma planta foi a única que desenvolveu os dois frutos de autopolinização, mencionados anteriormente.

Discussão

Senna macranthera apresentou atributos da morfologia floral típicos para o gênero, como corola amarela, anteras poricidas, heteranteria e enantiofilia (Dulberger 1981, Marazzi & Endress 2008). A maioria desses aspectos está estreitamente relacionada ao elaborado mecanismo de polinização que ocorre em praticamente todo o grupo, denominado “buzz-pollination”, efetuado exclusivamente por abelhas fêmeas que coletam pólen através da vibração do corpo, a qual é transmitida à flor, provocando a liberação do recurso (Buchmann 1983). Parte do pólen é utilizada na alimentação das larvas da abelha, mas outra parte eventualmente alcança o estigma de outras flores da espécie quando a abelha as visita (Buchmann 1983). O uso do termo “buzz-pollination” já foi apontado por Lewis *et al.* (2000) como atraente, porém enganoso, uma vez que a palavra “buzz” refere-se ao som emitido pela abelha durante a coleta de pólen por vibração e não ao ato de polinização em si. No entanto, é possível que a vibração também seja necessária para que os grãos de pólen alcancem o interior do estigma microscópico de algumas espécies do gênero (Dulberger 1981). Assim, apesar de vários aspectos desse mecanismo de polinização já terem sido investigados (c.f. Buchmann 1983), percebe-se que ainda há questões importantes a serem esclarecidas.

Como pólen é o único recurso presente nas flores de *Senna* e somente abelhas são capazes de obtê-lo legitimamente, as espécies do gênero são obrigatoriamente melitófilas. Além disso, nem todas as abelhas são capazes de causar a vibração necessária para a expulsão do pólen das anteras (Buchmann 1983), portanto, a melitofilia do grupo pode ser considerada mais restrita e especializada. Assim, apesar de ser bastante diverso quanto aos tipos de hábito e habitat exibidos por suas espécies (Irwin & Barneby 1982), o gênero é homogêneo quanto ao sistema de polinização. Como não apenas *Senna*, mas também *Cassia* e *Chamaecrista* apresentam esse mesmo mecanismo, temos toda uma subtribo (Cassiinae), ou ca. 660 espécies, exclusivamente melitófilas especializadas. Apesar de Leguminosae ser uma família polinizada tipicamente por abelhas (Arroyo 1981), há muitos exemplos de radiação adaptativa

nas flores do grupo (Vogel 1990) e, levando em consideração que a subfamília Caesalpinioideae é a que apresenta a maior diversidade floral na família (Lewis *et al.* 2000), a uniformidade encontrada em Cassiinae é surpreendente e pode ser considerada um indicativo da eficiência desse mecanismo. Mesmo que o grupo não seja monofilético, como pesquisas recentes indicam (revisado por Lewis 2005), e a similaridade encontrada entre a síndrome de polinização dos três gêneros seja resultado de convergência evolutiva e não de ancestralidade comum, o emprego do mesmo mecanismo de forma tão disseminada é admirável.

Apesar de apresentar um mecanismo de polinização especializado, as espécies de *Senna* e Cassiinae dependem de abelhas generalistas e nenhum caso de oligolectia em relação ao grupo foi confirmado, o que pode ser explicado pelo fato de que a extração de pólen por vibração é realizada principalmente por abelhas generalistas (Lewis *et al.* 2000). De fato, *Eulaema nigrita*, *Xylocopa frontalis* e *X. grisescens*, os polinizadores de *S. macranthera* em Serra Talhada, são abelhas generalistas. Além disso, a Caatinga é um ecossistema onde há poucos casos de oligolectia (Schlindwein 2004).

A corola amarela é outra característica universal em *Senna* (Marazzi *et al.* 2007), com grande importância para a atração de polinizadores. Em *S. didymobotrya*, não ocorreram visitas às flores cujas pétalas foram removidas (Dulberger 1981). A forte relação entre abelhas e flores amarelas é conhecida há bastante tempo, assim como a existência de padrões de coloração perceptíveis aos polinizadores, mas não à visão humana, produzidos por áreas da flor que absorvem luz UV (Harborne 1993). Esses contrastes são bastante frequentes em flores de néctar polinizadas por abelhas e têm a função de orientar o polinizador quanto à localização do recurso (e, adicionalmente, às partes reprodutivas da flor), sendo denominados de guias de néctar (Kay 1987, Harborne 1993). De maneira geral, flores de pólen são abertas e apresentam cores contrastantes no espectro de luz visível, razões pelas quais se supõem que não sejam necessários padrões diferenciais com luz UV para o direcionamento do polinizador

(Buchmann 1983). Em *Senna macranthera*, é provável que a atração dos polinizadores a longa distância seja realmente efetuada pela grande corola amarela de suas flores. No entanto, após a localização de um indivíduo florido, a escolha das flores e o posicionamento correto da abelha na flor parecem ser conduzidos por um padrão formado pelo contraste entre as pétalas, refletoras de UV, e as anteras, que apresentam regiões de absorção de UV, como demonstrado pelo teste com hidróxido de amônio. Esse mesmo padrão de anteras constituindo “guias de pólen” foi observado em *S. corymbosa* (Laporta 2005), mas quase nenhuma outra espécie do gênero foi investigada quanto a esse parâmetro, não sendo possível saber a extensão dessa característica no grupo.

Em *Senna*, apesar da homogeneidade na coloração da corola e no mecanismo geral de polinização, há uma grande diversidade de formas florais através das quais o mesmo objetivo (polinização por vibração) pode ser alcançado. Essa diversidade é consequência dos vários arranjos entre as diferentes formas de pétalas, estames e direcionamentos do pistilo encontrados nas espécies do gênero, originando flores zigomorfas ou assimétricas (Marazzi & Endress 2008). Avaliando os padrões de (as)simetria floral de 60 espécies de *Senna*, Marazzi e Endress (2008) encontraram seis tipos florais, o primeiro correspondendo a flores zigomorfas e/ou levemente enantioestílicas, e o restante correspondendo a flores assimétricas, com diversas combinações entre os tipos de corola, androceu e gineceu encontrados. Ao analisar a distribuição dos padrões de (as)simetria floral e morfologia das pétalas na árvore filogenética proposta para o gênero por Marazzi *et al.* (2006), os autores encontraram correlação entre certos padrões e clados, mas não entre todos. O Padrão 1, por exemplo, que corresponde a flores zigomorfas, foi encontrado tanto no Clado I, quanto no Clado VII, o mais basal e o mais distal na árvore filogenética do gênero, respectivamente (Marazzi & Endress 2006, 2008), levando os autores a concluir que esse tipo floral é o ancestral e que, posteriormente, houve reversão. No entanto, comparados a outras características florais que

não afetam a simetria (como a morfologia da antera, por exemplo, Marazzi & Endress 2007), os padrões florais envolvidos com a simetria são evolutivamente mais flexíveis e provêm menos suporte para a maioria dos clados e subclados de *Senna*.

Em *Senna macranthera*, todos os verticilos participam da construção da assimetria floral observada: o cálice é assimétrico, uma das pétalas inferiores é côncava, há a deflexão lateral de três estames férteis, sendo um colateral ao pistilo e dois opostos, e ocorre enantiostilia. Essa morfologia se encaixa no padrão quatro descrito por Marazzi e Endress (2008) e, de fato, outra variedade da espécie, *Senna macranthera* var. *nervosa*, incluída pelos autores em seu estudo, apresentou o mesmo padrão. Como enfatizado por Irwin e Barneby (1982), apesar da grande variabilidade morfológica encontrada em *S. macranthera* e exceto pela grande variação no tamanho do cálice, a flor conserva-se relativamente uniforme. Assim, é provável que vários dos achados aqui reportados possam se repetir em outras variedades da espécie.

De todas as características envolvidas na assimetria das flores de *Senna*, a heteranteria, restrita às flores de pólen (Buchmann 1983) é a menos polêmica. Sendo o pólen um recurso necessário tanto para as abelhas como para as plantas, a divisão das anteras em grupos de alimentação e de polinização é uma forma de reduzir o conflito gerado pela demanda das duas partes, garantindo a alimentação das larvas das abelhas e a polinização da espécie (Vogel 1978), e essa hipótese foi comprovada para *Solanum rostratum* em um trabalho experimental por Vallejo-Marín *et al.* (2009). Em *S. macranthera*, cinco anteras de alimentação provêm o recurso para as abelhas, enquanto as duas anteras opostas ao pistilo, auxiliadas pela pétala curvada que as circunda, são responsáveis pela deposição do pólen no corpo da abelha.

O papel da(s) pétala(s) curvada(s) nas flores de algumas espécies de *Senna* e de outros gêneros chamou menos a atenção dos pesquisadores do que a heteranteria, sendo mais recentemente elucidado. Sua função de guiar o pólen liberado pelas anteras de polinização até

uma área no corpo da abelha em que ela não o remova com facilidade já havia sido sugerido por alguns autores (e.g. Gottsberger & Silberbauer-Gottsberger 1988), mas foi testado e comprovado por Westerkamp (2004), através de análises minuciosas de simulações de vibração de flores com diapasão. Em *Senna macranthera*, a pétala curvada é necessária para que o pólen alcance a região dorsal da abelha, enquanto em outras espécies (e.g. *Senna corymbosa*, Laporta 2005) esse objetivo é alcançado através da curvatura da própria antera.

A função da enantioestilia parece ser a questão mais polêmica com relação às flores de pólen. A hipótese mais antiga e disseminada para explicar a evolução dessa característica é a de que ela favorece ou incrementa a polinização cruzada, uma vez que as flores de um morfo só poderão ser polinizadas com pólen de outro morfo (ver revisão em Barrett *et al.* 2000). Jesson e Barrett (2005) demonstraram a importância da enantioestilia em flores de *Solanum rostratum* para a redução da geitonogamia e o aumento da precisão na polinização cruzada. No entanto, mesmo com essa demonstração, a questão permanece em aberto, pelo menos no que diz respeito às flores de *Senna* e Cassiinae e, de acordo com Dulberger (1981) e Westerkamp (2004), a promoção de polinização cruzada não seria a função primária da enantioestilia nesse grupo, como será visto a seguir.

Em 1981, Dulberger argumentou que em algumas espécies de Cassiinae as anteras de polinização direcionam-se para os dois lados e que o estigma pode receber pólen dos dois tipos de flor, não havendo, portanto, redução nas taxas de geitonogamia. Para Dulberger, a função primária da enantioestilia seria liberar acesso para as abelhas às anteras de alimentação e ao mesmo tempo proteger o pistilo de injúria causada pela vibração. Essa proteção do pistilo foi o único argumento de Dulberger citado em trabalhos subseqüentes (e.g. Westerkamp 2004, Marazzi & Endress 2008).

Em 2004, Westerkamp formalizou a hipótese de que a função da enantioestilia em Cassiinae estaria relacionada com a divisão de trabalho entre as anteras, argumentando que: 1)

muitas flores dos dois morfos são encontradas no mesmo dia em cada planta; 2) as abelhas visitam várias flores do mesmo indivíduo; 3) há espécies em que a liberação do pólen ocorre nos dois lados da abelha; e 4) se o processo de vibração machucasse os pistilos, não haveria a diversidade de flores desse tipo que existe hoje. Para o autor, a evolução da enantiostilia, pelo menos em Cassiinae, seria uma consequência da heteranteria, ou seja, da necessidade de deposição do pólen em um local onde ele seria menos facilmente removido pela abelha, em geral a lateral e o dorso do animal. Para que isso ocorresse, algumas anteras teriam que ser deslocadas do centro da flor. A fim de alcançar o pólen em seu novo local de deposição, o pistilo também precisaria se deslocar. Para não obstruir o caminho da abelha, o pistilo poderia seguir uma das seguintes alternativas : 1) permanecer na posição mediana, alongando-se para poder alcançar o novo local de deposição de pólen, ou 2) deslocar-se para um dos lados da flor (enantiostilia), opção menos dispendiosa, segundo o autor.

A hipótese de Westerkamp é bastante plausível e pode ser incrementada com algumas observações: em *Cassia*, o gênero menos diversificado das Cassiinae, com apenas 30 espécies, as flores são zigomorfas (Irwin & Barneby 1982) e a deposição diferencial de pólen se dá através de heteranteria. Nesse gênero, os estames de fertilização e o pistilo são alongados e arqueados, em forma de foice, morfologia que se encaixa na primeira alternativa proposta por Westerkamp, a qual seria a mais dispendiosa. Em *Senna*, existem tanto espécies zigomorfas, como espécies enantiostílicas, e o processo de deposição diferencial de pólen teria se dado ou através do alongamento, mas não deflexão lateral, de estames e pistilo, caso das flores zigomorfas (alternativa um de Westerkamp) ou através da deflexão lateral de estames e pistilo (alternativa dois). A maior parte das espécies de *Senna* possui flores enantiostílicas (Marazzi & Endress 2008). Já em *Chamaecrista*, apesar dos estames serem pouco diferenciados, também ocorre deposição diferencial de pólen, mas agora através da pétala cuculada, a qual funciona como um prolongamento dos estames e por onde o pólen é

rebatido diversas vezes até alcançar o corpo da abelha (Gottsberger & Silberbauer-Gottsberger 1988, Westerkamp 2004). Nessas espécies, o pistilo também é alongado e deslocado para o lado oposto ao da pétala cuculada. O maior número de espécies enantiostílicas de *Senna* somadas ao número de espécies de *Chamaecrista* em comparação ao número de espécies zigomorfas de *Senna* e *Cassia* pode ser um indício a favor do raciocínio de Westerkamp, inclusive de que a segunda alternativa é menos dispendiosa.

Outra característica interessante em flores de pólen é a ocorrência de dimorfismo nos grãos de pólen das diferentes anteras (Buchmann 1983). No presente trabalho, a viabilidade polínica foi testada indiretamente através de coloração do citoplasma dos grãos com carmim acético e não se observou nenhuma diferença entre a coloração e o tamanho dos grãos de pólen de diferentes tipos de antera. Dentre as espécies de *Senna* testadas quanto a diferenças na viabilidade polínica através de coloração dos grãos e de polinizações controladas, foram registrados tanto casos de diferentes viabilidades associadas aos diferentes tipos de antera (e.g. *S. sylvestris*, Carvalho & Oliveira 2003), como casos onde o pólen das anteras de alimentação e de fertilização apresentou a mesma viabilidade (e.g. *S. multijuga*, Wolowski & Freitas 2010). Em *S. sylvestris*, apesar dos diferentes grãos terem corado com carmim acético, a coloração foi diferencial, com o pólen das anteras de fertilização apresentando coloração mais intensa, enquanto os grãos das anteras de polinização apresentaram citoplasma menos denso e com um grande vacúolo (Carvalho & Oliveira 2003). Além disso, houve diferença significativa entre o tamanho dos grãos dos diferentes tipos de antera (Carvalho & Oliveira 2003). Já em *S. multijuga*, a coloração e a morfologia não foram diferentes. Mesmo que não tenha sido testada através de polinizações controladas, os dados obtidos para *S. macranthera* sugerem que não há diferença entre a viabilidade polínica das diferentes anteras, mas apenas uma análise com polinizações cruzadas ou germinação *in vitro* poderia esclarecer.

A autoincompatibilidade observada em *Senna macranthera* apresenta aspectos interessantes a serem discutidos. Dos sete indivíduos analisados, apenas um formou frutos após autopolinizações manuais. Existem casos na literatura que reportam a ocorrência de espécies autoincompatíveis que apresentaram uma pequena fração de indivíduos autocompatíveis (e.g. Bawa 1974). De acordo com esse autor, uma hipótese para explicar essa quebra na autoincompatibilidade seria a possibilidade de garantir o sucesso reprodutivo mesmo em condições desfavoráveis, como a ausência de outros indivíduos para a ocorrência de polinização cruzada, o que seria especialmente vantajoso em espécies herbáceas pioneiras, mas menos provável de ocorrer em espécies perenes. No entanto, das quatro espécies que apresentaram quebra da autoincompatibilidade no estudo de Bawa, todas lenhosas, três ocupavam habitats em estágios sucessionais iniciais. Essa plasticidade pode ser o caso de *S. macranthera*, que mostra alta tolerância a ambientes perturbados, como indica sua ocorrência frequente em bordas de estradas e pastagens (observação pessoal, L. Borges).

Embora não tenha sido avaliado o mecanismo de autoincompatibilidade em *Senna macranthera*, é possível que a espécie também apresente autoincompatibilidade de ação tardia, como reportado para outras espécies do gênero (*S. sylvestris*, Carvalho & Oliveira 2003, *S. multijuga*, Wolowski & Freitas 2010). Esse mecanismo é caracterizado pelo aborto da flor após a chegada do tubo polínico no ovário, ou, mais comumente, após a penetração do tubo no óvulo (Seavey & Bawa 1986). Embora a existência desse mecanismo seja controversa, uma vez que o aborto poderia resultar da depressão endogâmica causada pela autofecundação, há algumas características sugeridas para diferenciar os dois processos, como o aborto uniforme de flores e frutos, em um dado intervalo de tempo, o que caracterizaria um mecanismo de autoincompatibilidade, enquanto a depressão endogâmica ocorreria por todo o período de tempo de maturação dos frutos (Sage 1994). Em *Senna macranthera*, mais de 90% das flores e frutos dos tratamentos de autopolinização manual caíram até quinze dias após o

tratamento. Uma hipótese para explicar a ocorrência desse mecanismo de autoincompatibilidade seria a garantia de sucesso reprodutivo mesmo em condições adversas (Seavey & Bawa 1986), como também parece ter ocorrido em *Senna macranthera*, onde o único indivíduo autocompatível apresentou baixo sucesso reprodutivo devido à predação de frutos.

A comparação das taxas de aborto dos diferentes tratamentos (Fig. 2) indica que a curva de formação natural de frutos, bem abaixo da de polinizações cruzadas, foi bastante semelhante à de autopolinizações manuais. Assim, é possível que a menor formação de frutos sob condições naturais tenha sido consequência de uma grande quantidade de polinizações inviáveis (incompatíveis), ou seja, geitonogamia. Essa seria uma ótima oportunidade para testar a função da enantiostilia como redutora de geitonogamia.

Por fim, vale a pena tratar das análises de sistema reprodutivo em espécies de *Senna*. Apenas onze espécies do gênero foram avaliadas quanto a esse parâmetro (incluindo o presente estudo), o que significa 3,6% do gênero. Dos sete cladogramas (I-VII) e quatro subcladogramas (IVa e IVb, VIIa e VIIb) propostos na filogenia de *Senna* (Marazzi *et al.* 2006), dois subcladogramas (IVa e VII b) não tiveram nenhuma espécie analisada com relação a esse parâmetro. Considerando o número de espécies analisadas por clado, apenas os cladogramas II e VI tiveram mais de uma espécie estudada (três e duas espécies, respectivamente). De acordo com os tipos de (as)simetria floral encontrados por Marazzi e Endress (2008), nenhuma espécie do Padrão 6 foi estudada quanto ao sistema reprodutivo e apenas uma do Padrão 3 foi avaliada, sendo autoincompatível. Todos os outros tipos florais apresentaram uma espécie autocompatível e uma autoincompatível. O único registro de apomixia no gênero, *S. artemisioide* (Randell, 1970), pertence ao clado IVa e Padrão 5. Apenas uma espécie (*S. acclinis*, Williams 1998) não foi encaixada em nenhum clado proposto por Marazzi *et al.* (2006). A autogamia sugerida

para algumas espécies (*S. uniflora*, *S. bauhinioides*, Irwin & Barneby 1982), merece ser investigada em detalhe.

Assim, fica claro que, apesar de *Senna* apresentar um mecanismo de polinização bastante conhecido, diversos aspectos da biologia reprodutiva do gênero carecem de informações suficientes para se testar a existência de tendências e padrões. Estudos sobre reflexão e absorção de luz UV na corola, viabilidade polínica de diferentes anteras, função da enantiostilia e sistema reprodutivo são necessários para se chegar a esse conhecimento.

Agradecimentos

Ao Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), pela permissão para realização do estudo na Estação Experimental de Serra Talhada; a Gilcean Jones, pela ajuda no trabalho de campo; A Thamires Campos, pela ajuda no trabalho de campo e pelo acompanhamento diário da formação de frutos; A Éville Ribeiro, pela ajuda no trabalho de laboratório; A Débora Coelho, pela identificação das abelhas; Ao CNPq, pela bolsa de doutorado concedida a L. Borges e pelas bolsas de produtividade em pesquisa concedidas a I. Machado e A. Lopes, além do apoio financeiro concedido a projeto de pesquisa coordenado por A. Lopes (Processo CNPq nº 567739/2008-2).

Referências

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.

- Barrett S. C. H., Jesson, L. K. & Baker A. M. (2000) The Evolution and Function of Styler Polymorphisms in Flowering Plants. *Annals of Botany* **85**: 253-265.
- Bawa K. S. (1974) Breeding systems of tree species of a lowland tropical community. *Evolution* **28**, 85-92.
- Buchmann S. L. (1983) Buzz Pollination in Angiosperms. In: Jones, C. E. & Little, J. R. (eds.). *Handbook of experimental pollination biology*. Van Nostrand Reinhold, New York, pp. 73-113.
- Carvalho D. A. & Oliveira P. E. (2003) Biologia reprodutiva e polinização de *Senna sylvestris* (Vell.) H.S. Irwin & Barneby (Leguminosae, Caesalpinioideae). *Revista Brasileira de Botânica* **26**: 319-328.
- Dulberger R. (1981) The Floral Biology of *Cassia didymobotrya* and *C. auriculata* (Caesalpinaceae). *American Journal of Botany* **68**: 1350-1360.
- Ferraz E. M. N., Rodal M. J. N. & Sampaio E. V. S. B. (2003) Physiognomy and structure of vegetation along an altitudinal gradient in the semi-arid region of northeastern Brazil. *Phytocoenologia* **33**: 71-92.
- Gottsberger G. & Silberbauer-Gottsberger I. (1988) Evolution of Flower Structures and Pollination in Neotropical Cassiinae (Caesalpinaceae) Species. *Phyton (Austria)* **28**: 293-320.
- Harborne J. B. (1993) *Introduction to Ecological Biochemistry*, 4^a ed. Elsevier Academic Press.
- Irwin H. S. & Barneby R. C. (1982) The American Cassiinae. A synoptical revision of Leguminosae tribe Cassieae subtribe Cassiinae in the New World. *Memoirs of the New York Botanical Garden* **35** (1 & 2): 1-918.
- Jesson L. K. & Barrett S. C. H. (2003) The comparative biology of mirror-image flowers. *International Journal of Plant Sciences* **164**: S237-S249.

- Kay Q. O. N. (1987) Ultraviolet patterning and ultraviolet-absorbing pigments in flowers of the Leguminosae. In: Stirton C. H. (ed.). *Advances in Legume Systematics, Part 3*. Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 317–353.
- Laporta C. (2005) Floral biology and reproductive system of enantiostylous *Senna corymbosa* (Caesalpinaceae). *Revista de Biología Tropical* **53**: 49-61.
- Leite, A. V. L. & Machado, I. C. (2010) Reproductive biology of woody species in Caatinga, a dry forest of Northeastern Brazil. *Journal of Arid Environments*, in press.
- Lewis G. P. (2005) Tribe Cassieae. In: Lewis G., Schrire B., Mackinder B. & Lock M. (eds.). *Legumes of the world*. Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 111-125.
- Lewis G. P., Simpson B. B. & Neff J. L. (2000) Progress in understanding the reproductive biology of the Caesalpinioideae (Leguminosae). In: Herendeen P. S., Bruneau A. (eds.). *Advances in Legume Systematics, vol.9*. Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 65-78.
- Marazzi B. & Endress P. K. (2008) Patterns and development of floral asymmetry in *Senna* (Leguminosae, Cassiinae). *American Journal of Botany* **95**: 22-40.
- Marazzi B., Conti E. & Endress P. K. (2007) Diversity in anthers and stigmas in the buzz-pollinated genus *Senna* (Leguminosae, Cassiinae). *International Journal of Plant Sciences* **168**: 371-391.
- Marazzi B., Endress P. K., Queiroz L. P. & Conti E. (2006) Phylogenetic relationships within *Senna* (Leguminosae, Cassiinae) based on three chloroplast regions: patterns in the evolution of floral symmetry and extrafloral nectaries. *American Journal of Botany* **93**: 288-303.
- Queiroz L. P. (2009) *Leguminosae da Caatinga*. Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.
- Radford A. E., Dickinson W. C., Massey J. R. & Bell C. R. (1974) *Vascular Plant Systematics*. Harper & Row Publishers, New York.

- Randell B. R. (1970) Adaptations in the genetic system of Australian arid zone *Cassia* species (Leguminosae, Caesalpinioideae). *Australian Journal of Botany* **18**: 77–97.
- Sage T. L., Bertin R. & Williams E. G. (1994) Ovarian and other late-acting self-incompatibility. In: Williams E. B., Knox R. B. & Clarke A. E. (eds.). *Genetic Control of Self-incompatibility and Reproductive Development in Flowering Plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 116–140.
- Schlindwein, C. (2004) Are oligolectic bees always the most effective pollinators? In: Freitas B. M. & Pereira J. O. P. (eds.). *Solitary Bees – Conservation, Rearing and Management for Pollination*. Federal University of Ceará, Fortaleza, pp. 231-240.
- Scogin R., Young D. A. & Jones Jr. C. E. (1977) Anthochlor pigments and pollination biology. II. The ultraviolet floral pattern of *Coreopsis gigantea* (Asteraceae). *Bulletin of the Torrey Botanical Club* **104**: 155–159.
- Seavey S. R. & Bawa K.S. (1986) Late-acting self-incompatibility in Angiosperms. *The 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.
- Simpson B. B. (1977) Breeding Systems of Dominant Perennial Plants of Two Disjunct Warm Desert Ecosystems. *Oecologia* **27**: 203-226.
- Vallejo-Marín M., Manson J. S., Thomson J. D. & Barrett S. C. H. (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*. Linnean Society Symposium Series nº 6, Linnean Society of London, Academic Press, pp. 89-96.

- Vogel S. (1990) Radiación adaptativa del síndrome floral em las familias neotropicales. *Boletín de la Academia Nacional de Ciencias* **59**: 5–30.
- Westerkamp C. (2004) Ricochet pollination in Cassias – and how bees explain enantiostily (Preliminary Communication). In: Freitas B. M. & Pereira J. O. P. (eds.). *Solitary Bees – Conservation, Rearing and Management for Pollination*. Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, p. 225-230.
- Wolowski M. & Freitas L. (2010) Sistema reprodutivo e polinização de *Senna multijuga* (Fabaceae) em Mata Atlântica Montana. *Rodriguesia* **61**: 167-179.
- Williams G. (1998) Bee pollination in the threatened Australian shrub *Senna acclinis* (Caesalpinioideae). *Cunninghamia* **5**: 767-772.
- Zapata T. R. & Arroyo M. T. K. (1978) Plant reproductive ecology of a secondary deciduous tropical forest in Venezuela. *Biotropica* **10**: 221–230.

Tabela 1. Visitantes florais de *Senna macranthera* var. *pudivunda* (Leguminosae - Caesalpinioideae) em Serra Talhada, Pernambuco, Brasil, com respectivos comportamentos de visita.

Visitante	Comportamento de visita
Apidae	
<i>Eulaema nigrita</i> Lepeletier, 1841	Polinizador
<i>Exomalopsis analis</i> Spinola, 1853	Pilhador
<i>Trigona spinipes</i> (Fabricius, 1793)	Pilhador
<i>Xylocopa frontalis</i> (Olivier, 1789)	Polinizador
<i>Xylocopa grisescens</i> Lepeletier, 1841	Polinizador
Halictidae	
<i>Augochlora esox</i> (Vachal, 1911)	Pilhador
<i>Pseudaugochlora pandora</i> (Smith, 1853)	Pilhador

Tabela 2. Formação de frutos maduros após tratamentos de polinização manual controlada (autopolinização e polinização cruzada) e sob condições naturais em flores de *Senna macranthera* var. *pubibunda* ocorrente em Serra Talhada, PE.

Tratamento	Flores <i>N</i>	Frutos <i>N</i> (%)
Autopolinização	70	2 (2,86%)
Polinização cruzada	70	48 (68,57%)
Polinização natural	90	15 (16,67%)



Fig. 1. Flor e visitantes florais de *Senna macranthera* var. *pudibunda* em Serra Talhada, Pernambuco, Brasil. (A) Vista frontal da flor, exibindo a heteranteria, a enantiostilia e a curvatura de uma das pétalas inferiores, responsável pelo ricochete e deposição do pólen na região dorsal das abelhas polinizadoras; (B) Resultado do teste com hidróxido de amônio, indicando o contraste entre as metades superior e inferior das anteras; (C) *Xylocopa grisescens*, polinizadora, coletando pólen (notar o dorso coberto de pólen - seta); (D) *Exomalopsis analis*, pilhadora, coletando pólen por vibração, sem contatar o estigma (observar as corbículas cheias de pólen); (E) *Trigona spinipes*, pilhadora, coletando pólen após perfurar as anteras com as mandíbulas.

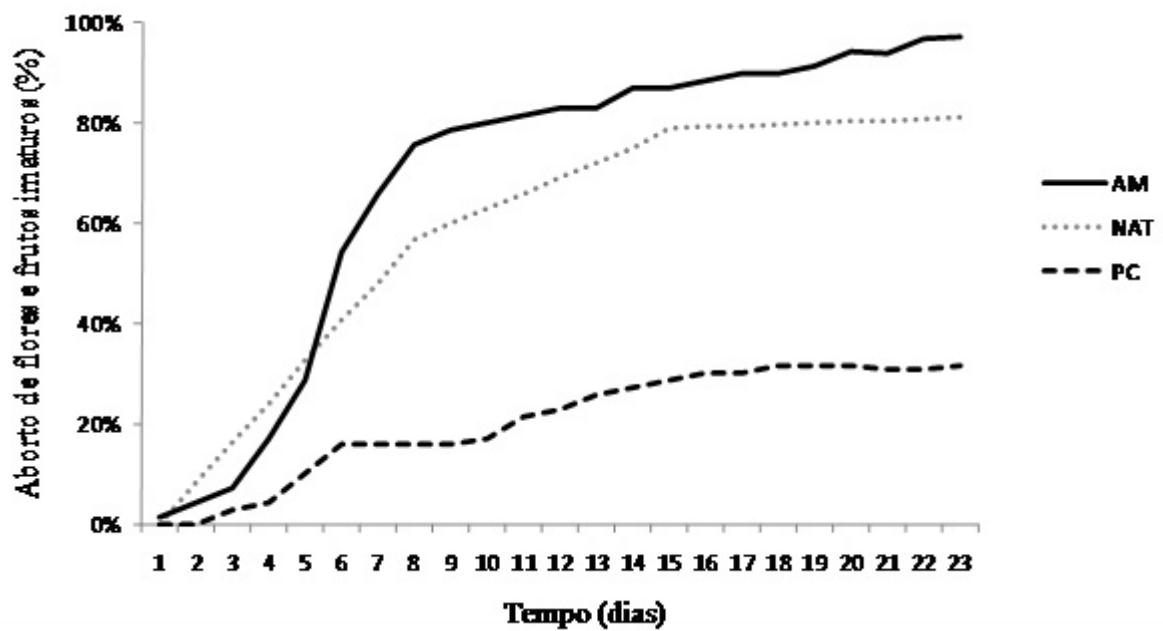


Fig. 2. Taxa acumulada de aborto de flores e frutos imaturos a partir de tratamentos de polinização manual controlada e sob condições naturais em *Senna macranthera* var. *pubibunda* ocorrente em Serra Talhada, Pernambuco, Brasil. AM: autopolinização manual; NAT: polinização sob condições naturais; PC: polinização cruzada manual.

CONCLUSÕES

As três espécies analisadas no presente trabalho representam importantes recursos para os insetos de suas comunidades. As duas espécies com néctar como recurso floral, *Anadenanthera colubrina* e *Libidibia ferrea*, florescem na estação seca e na transição da estação seca para a chuvosa, respectivamente, período em que há menor disponibilidade de recursos no ecossistema, e suas árvores são bastante visitadas principalmente por abelhas, mas também por outros insetos. Todas as espécies apresentaram algum grau de florivoria. Assim, suas flores também foram importantes para insetos que consumiam outras partes florais, com possível prejuízo reprodutivo para as plantas. À exceção dos tetraplóides em *Libidibia ferrea*, todas as espécies estudadas dependem de vetores de pólen para a reprodução, uma vez que são autoincompatíveis.

RESUMO

A família Leguminosae é a mais rica na Caatinga. O objetivo do presente trabalho foi investigar a biologia reprodutiva de espécies de Leguminosae ocorrentes em áreas do ecossistema Caatinga. Estudos de caso foram realizados com três espécies lenhosas típicas e abundantes nas áreas do ecossistema no estado de Pernambuco: *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan (angico) (Mimosoideae), *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz (jucá ou pau-ferro) e *Senna macranthera* (Collad.) H.S. Irwin & Barneby (pau-de-besouro ou são-jão) (ambas Caesalpinioideae). *Anadenanthera colubrina* foi estudada em Serra Talhada e floresceu na estação seca. A espécie é andromonóica, autoincompatível e polinizada principalmente por abelhas (*Apis mellifera* e *Trigona spinipes*). Um importante resultado obtido através desse estudo, com implicações evolutivas, foi a descoberta do local de produção de néctar em suas flores, que ocorre no ápice das pétalas, constituindo um nectário substitutivo, um registro inédito para a subfamília. *Libidibia ferrea*, recentemente segregada do gênero *Caesalpinia*, é uma espécie arbórea que apresenta grande variabilidade morfológica. Uma possível causa para esse fato pode ser a ocorrência de poliploidia na espécie, que apresenta tanto populações diplóides, como tetraplóides, além de algumas populações mistas. O trabalho investigou detalhes morfológicos e ecológicos da reprodução da espécie, sempre comparando diplóides e tetraplóides, ocorrentes nos municípios de Alagoinha e Poção, e analisou o sistema, o sucesso e o isolamento reprodutivo de e entre os citótipos. Houve diferença significativa entre o tamanho floral de diplóides e tetraplóides e ambos os citótipos compartilharam as mesmas espécies de polinizadores, abelhas dos gêneros *Centris* e *Xylocopa*. Enquanto os diplóides se mostraram autoincompatíveis, os tetraplóides foram autocompatíveis. Não houve formação de fruto nos cruzamentos entre os citótipos e ambos apresentaram baixa formação natural de frutos. As implicações ecológicas, taxonômicas e para planos de conservação e reflorestamento são discutidas. *Senna macranthera* também apresenta alto polimorfismo infraespecífico, com o reconhecimento de oito variedades. *Senna macranthera* var. *pubibunda*, endêmica da Caatinga, foi estudada em Serra Talhada, quanto à biologia floral, à ecologia da polinização e o sistema e sucesso reprodutivos. A espécie é autoincompatível e conseqüentemente dependente de seus polinizadores, espécies de abelhas dos gêneros *Eulaema* e *Xylocopa*, sendo um fator-chave para a reprodução de várias espécies de abelhas, que utilizam o pólen de suas flores na alimentação das larvas.

ABSTRACT

Leguminosae is the most numerous family in Caatinga. The aim of this study was to investigate the reproductive biology of legume species in this ecosystem. Case studies were carried out with three frequent and abundant wood species in Caatinga areas of Pernambuco state: *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan (angico) (Mimosoideae), *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz (jucá or pau-ferro) and *Senna macranthera* (Collad.) H.S. Irwin & Barneby (pau-de-besouro or são-joão) (both Caesalpinioideae). *Anadenanthera colubrina* was studied in Serra Talhada and flowered during the dry season. It's an andromonoecious species, self-incompatible and pollinated mainly by bees (*Apis mellifera* and *Trigona spinipes*). An important result of this work, with evolutionary implications, was the discovery of the nectar producing site in the flowers, which occurs at the top of the petals, constituting a substitutive nectary, the first record for the subfamily. *Libidibia ferrea*, recently segregated from *Caesalpinia*, is a tree with great morphological diversity. A possible reason for this variation may be the occurrence of polyploidy in the species, which presents diploid, tetraploid and mixed populations. The study investigated ecological and morphological aspects of the species reproduction, comparing di- and tetraploids from Alagoinha and Poção municipalities, and analyzed the breeding system, the reproductive success and the reproductive isolation of and between ploidies. There were significant differences between floral size from di- and tetraploids and both shared the same pollinators, bee species from the genera *Centris* and *Xylocopa*. Diploids were self-incompatible and tetraploids were self-compatible. There was no fruit set after between-ploidy crosses and both cytotypes showed a low fruit set under natural conditions. The ecological, taxonomic and conservation implications are discussed. *Senna macranthera* also presents a high infraspecific polymorphism, with eight varieties. The floral biology, pollination ecology, breeding system and reproductive success of *S. macranthera* var. *pudibunda*, endemic to Caatinga, were studied in Serra Talhada. The species is self-incompatible and consequently it depends from its pollinators, bees from the genera *Eulaema* and *Xylocopa*, and is a key species for the reproduction of these bees, which use the pollen in the food of their larvae.