

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE BOTANICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL
ISABELLE FERNANDES DE ALBUQUERQUE

**Fenologia, atributos florais e fluxo polínico entre citótipos diploides e tetraploides de
Libidibia ferrea (Leguminosae)**

RECIFE
2014

ISABELLE FERNANDES DE ALBUQUERQUE

**Fenologia, atributos florais e fluxo polínico entre citótipos diploides e tetraploides de
Libidibia ferrea (Leguminosae)**

Dissertação apresentada aos membros da banca avaliadora e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

Orientadora: Prof^a Dr^a Ariadna Valentina Lopes

Coorientadora: Prof^a Dr^a Laís Angélica Borges

Área de concentração: Ecologia Vegetal

Linha de pesquisa: Ecologia de populações e comunidades vegetais

RECIFE
2014

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Albuquerque, Isabelle Fernandes de
Fenologia, atributos florais e fluxo polínico entre citótipos diploides e tetraploides de *Libidia ferrea* (Leguminosae) / Recife: O Autor, 2014.

55 folhas: fig., tab.

Orientadora: Ariadna Valentina Lopes

Coorientadora: Laís Angélica Borges

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de

Pernambuco. Centro de Biociências. Biologia Vegetal, Recife, 2014.

Inclui referências

- 1. Leguminosa 2. Pólen 3. Fenologia vegetal I. Lopes, Ariadna Valentina (orient.) II. Borges, Laís Angélica (orient.) II. (coorient.) III. Título**

583.74

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017- 524

ISABELLE FERNANDES DE ALBUQUERQUE

**Fenologia, atributos florais e fluxo polínico entre citótipos diploides e tetraploides de
Libidibia ferrea (Leguminosae)**

Aprovado em: 28.02.2014

Banca Examinadora:

Prof^a Dr^a LAÍS ANGÉLICA BORGES (Coorientadora)
Departamento de Ciências Biológicas – UFPB

Prof^a Dr^a ANDREA PEDROSA HARAND (Titular interno)
Departamento de Botânica – UFPE

Dr^o OSWALDO CRUZ NETO (Titular externo)
Departamento de Botânica – UFPE (Pós-Doutorando)

Prof^o Dr^o MAURO GUIDA DOS SANTOS (Suplente interno)
Departamento de Botânica – UFPE

Dr^a SANDRA FREITAS DE VASCONCELOS (Suplente externo)
Departamento de Botânica - UFPE (Pós-Doutoranda)

**RECIFE
2014**

Aos moradores do município de Poção,
com gratidão e carinho, dedico.

AGRADECIMENTOS

De tantos momentos e pessoas que fizeram este trabalho, eu seria incapaz, dentre tantos, de agradecer em poucas palavras. Esta dissertação só foi possível com a ajuda de todos vocês, moradores, amigos e familiares, por todo apoio, seja através da ajuda em campo e laboratório, caronas (moto, carro ou lotação), conversas e amizade. Minha gratidão e certeza de que este trabalho é uma linda soma de pessoas e corações.

À minha Orientadora Ariadna Lopes não apenas pela orientação, mas pelo acolhimento e confiança. Poucas pessoas tem o dom de tranquilizar e orientar com tanto carinho e humanidade, tive muita sorte em encontrá-la.

À minha coorientadora Laís Borges por me confiar este trabalho, pela amizade, conversas e ajuda em campo e por toda a colaboração ao longo desses dois anos.

Aos meus queridos amigos de Poção, Dona Dôdori, Dona Nêga, Seu Lôro e Adriana, por me acolherem em suas casas de braços e corações abertos.

À Marta, por me receber em Pesqueira sempre que precisei.

Aos meus mini ajudantes de campo: Armandinho, Bárbara e Mayara. Todo meu carinho e desejo de que, no futuro, continuem com tantas árvores frondosas para brincar.

Ao Dr. Luís Gustavo e ao Laboratório de Citogenética Vegetal, pela disponibilidade e ajuda com o citômetro de fluxo.

Aos integrantes do Laboratório de Biologia Floral e Reprodutiva (POLINIZAR), especialmente Marcela Woolley, Ana Carolina, Elivania Barral, Marcela Tomaz, Artur Maia, Joel Queiroz e Jéssica Luíza.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da UFPE e à CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

RESUMO

A poliploidia é conhecida como um dos poucos processos de especiação capazes de atuar em simpatria. Modelos teóricos tentam explicar as circunstâncias ecológicas e genéticas que regem as interações entre diploides e tetraploides em populações mistas, como o “modelo da exclusão do citótipo em minoria”, segundo o qual poliploides ficam em desvantagem nessas zonas, que levam a sua exclusão. Mecanismos de isolamento pré-zigótico podem ser encontrados em populações mistas como forma de contrariar a força do modelo e permitir o estabelecimento da linhagem poliploide. Esse trabalho teve como objetivo investigar a ocorrência de isolamento reprodutivo pré-zigótico entre diferentes citótipos de *Libidibia ferrea* (Leguminosae) localizados em populações mistas. Foram realizadas observações sobre a fenologia, atributos florais, fluxo polínico, polinizadores e frequência de visitas nos citótipos diploides e tetraploides da espécie. Indivíduos de ambos citótipos floresceram durante o mesmo período, embora com intensidades diferentes. Quanto aos atributos florais, tetraploides apresentaram flores significativamente maiores, incluindo tamanho dos grãos de pólen, que os diploides. Os citótipos compartilham, de um modo geral, a assembleia de polinizadores, havendo, entretanto, diferença sutil quanto à deposição de no corpo deles, dependendo de qual citótipo visitam, e quanto ao número de espécies de polinizadores, maior em tetraploides. Além disso, a frequência de visitas dos polinizadores comuns aos dois citótipos foi significativamente maior no tetraploide. Apesar das diferenças nos locais de deposição de pólen no corpo dos polinizadores comuns aos dois citótipos, ocorreu discreto fluxo polínico e bastante diferencial entre os citótipos: apenas 50% dos estigmas diploides continham no máximo 8,8% de grãos tetraploides; apenas 50% dos estigmas tetraploides continham no máximo 4.8% de grãos diploides. Estes resultados indicam que existiu forrageamento preferencial pelos polinizadores, o que pode ter contribuído para minimizar o fluxo polínico entre os citótipos, sendo esta a principal barreira pré-zigótica em *L. ferrea*.

Palavras-chave: Fluxo de pólen. Mecanismos pré-zigóticos. Poliploidia.

ABSTRACT

Polyploidy is one of the few processes of speciation that takes place in sympatry. Theoretical models attempt to explain the ecological and genetic conditions that govern the interactions between diploid and tetraploid in mixed populations, as the "model of cytotype exclusion in the minority", whereby polyploid are disadvantaged in these areas, leading to their exclusion. Mechanisms pre-zygotic isolation can be found in mixed populations as a means to counteract the force of the model and allow the establishment of polyploid strain. This study aimed to investigate the occurrence of pre-zygotic reproductive isolation between different cytotypes of *Libidibia ferrea* (Leguminosae) located in mixed populations. Observations on phenology, floral traits, pollen flow, and frequency of pollinator visits to diploid and tetraploid cytotypes of the species were performed. Individuals of both cytotypes flourished during the same period, but with different intensities. As for the floral attributes presented tetraploid significantly larger flowers, including the size of pollen grains, the diploid. Cytotypes share, a general meeting of the pollinators, there are, however, subtle differences regarding the deposition in their body, depending on which cytotype visit, and on the number of pollinator species, higher in tetraploid. In addition, the frequency of visits by pollinating common to both cytotypes was significantly higher in tetraploid. Despite the differences in local deposition of pollen in the body of the two cytotypes common pollinators, pollen flow and discrete enough differential between cytotypes occurred: only 50% of diploid stigmas contained at most 8.8% of tetraploid grains, only 50% of tetraploid stigmas contained at most 4.8% of diploid grains. These results indicate that there was preferential foraging by pollinators, which may have contributed to minimize pollen flow between cytotypes, which is the main barrier in pre-zygotic *L. ferrea*.

Key words: Flow of pollen. Pre-zygotic mechanisms. Polyploidy.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Morfometria floral (média \pm desvio padrão) de citótipos diploides e tetraploides de <i>Libidibia ferrea</i> (Leguminosae - Caesalpinioideae) localizados em população mista no município de Poção, Pernambuco.....	44
Tabela 2	Número de flores por inflorescência, número de flores abertas/dia e razão P/O (pólen/óvulo) (média \pm desvio padrão) de indivíduos diploides e tetraploides de <i>Libidibia ferrea</i> (Leguminosae - Caesalpinioideae) em população mista no município de Poção, Pernambuco.....	45
Tabela 3	Visitantes florais, com respectivos recursos florais coletados e comportamentos de visitas, de indivíduos diplóides (D) e tetraploides (T) de <i>Libidibia ferrea</i> (Leguminosae - Caesalpinioideae) localizados em população mista no município de Poção, Pernambuco.....	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	<p>Figura 1. (A-D) Porcentagem de indivíduos diploides e tetraploides de <i>Libidibia ferrea</i> (Leguminosae - Caesalpinioideae) localizados em população mista no município de Poção, Pernambuco, com suas respectivas fenofases ao longo dos meses de observação: A) Fenofase botão; B) Fenofase flor; C) Fenofase frutos verdes. D) Fenofase frutos maduros. Indivíduos diploides são representados pelas linhas tracejadas, e indivíduos tetraploides pelas linhas contínuas.....</p>	49
Figura 2	<p>(A-D) Índice de intensidade de Fournier em indivíduos diploides e tetraploides de <i>Libidibia ferrea</i> (Leguminosae - Caesalpinioideae) localizados em população mista no município de Poção, Pernambuco, com suas respectivas fenofases ao longo dos meses de observação: A) Fenofase botão; B) Fenofase flor; C) Fenofase frutos verdes. D) Fenofase frutos maduros. Indivíduos diploides são representados pelas linhas tracejadas, e indivíduos tetraploides pelas linhas contínuas.....</p>	50
Figura 3	<p>Número total de inflorescências visitadas ao longo da antese floral nos citótipos tetraploides (A) e diploides (B) de <i>Libidibia ferrea</i> (Leguminosae - Caesalpinioideae) localizados em população mista no município de Poção, Pernambuco.....</p>	51
Figura 4	<p>Número total de flores visitadas pelos polinizadores efetivos dos gêneros <i>Centris</i> e <i>Xylocopa</i> (abelhas) nos citótipos diploides e tetraploides de <i>Libidibia ferrea</i> (Leguminosae - Caesalpinioideae) localizados em população mista no município de Poção, Pernambuco.....</p>	52
Figura 5	<p>Número total de grãos de pólen depositados em estigmas de citótipos diploides e tetraploides de <i>Libidibia ferrea</i> (Leguminosae - Caesalpinioideae) localizados em população mista no município de Poção, Pernambuco.....</p>	53

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. FUNDAMENTAÇÃO.....	14
2.1 Poliploidia.....	14
2.2 Evolução e poliploidia.....	15
2.3 Distribuição dos poliploides e mecanismos de isolamento pré-zigóticos.....	15
2.4 Espécie modelo.....	18
3. MANUSCRITO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO PLANT SYSTEMATICS AND EVOLUTION.....	19
REFERENCIAS.....	54

1. INTRODUÇÃO

A multiplicação do genoma em três ou mais conjuntos completos de cromossomos, definida como poliploidia (RAMSEY & SCHEMSKE, 1998), é considerada uma das formas de especiação mais comuns em angiospermas (SOLTIS et al., 2004). Diferente de outros processos de especiação, a poliploidia pode conferir imediato isolamento reprodutivo entre indivíduos e (LEVIN, 1983; HUSBAND & SABARA, 2003), por esse motivo, tem sido reconhecida como um dos poucos mecanismos capazes de atuar em simpatria simpatria (SOLTIS et al., 2007).

Diversos modelos teóricos tentam explicar como circunstâncias ecológicas e genéticas que regem as interações entre diploides e tetraploides em populações mistas (e.g. LEVIN 1975; FELBER 1991; RODRIGUEZ 1996). Um dos mais discutidos é o “Modelo da Exclusão do Citótipo em Minoria”, proposto por Levin (1975). De acordo com esse modelo, os novos poliploides formados ficariam em desvantagem, porque estão mais propensos ao recebimento de pólen do citótipo em maioria, e esse cruzamento geraria indivíduos triploides, que são inviáveis ou estéreis, reduzindo, portanto, o sucesso reprodutivo dos poliploides. Dessa forma no início do estabelecimento os novos poliploides formados sofrem consequências negativas pelo seu baixo número dentro da população até desenvolverem barreiras que permitam seu estabelecimento e coexistência com seus progenitores

Dentre as barreiras desenvolvidas por populações mistas podemos destacar a fenologia (com diferenças na floração dos diferentes citótipos) (SEGRAVES & THOMPSON, 1999), mudanças na atratividade floral (JERSÁKOVÁ et al., 2010) e fidelidade do polinizador (HUSBAND & SCHEMSKE, 2000). Embora essas barreiras venham sendo largamente reconhecidas, estudos com enfoque no papel do isolamento reprodutivo por mecanismos pré-zigóticos, tem sido alvo de poucos estudos (HUSBAND & SABARA, 2003; KENEDY et al., 2006; JERSAKOVA et al., 2010). Dessa forma, estudos dessa natureza são de fundamental importância para entender as forças que regem a viabilidade e a fertilidade entre diferentes citótipos, bem como a regulação e o estabelecimento de indivíduos poliploides.

O presente estudo teve por objetivo verificar a ocorrência de barreiras pré-zigóticas em uma população mista da espécie arbórea *Libidibia ferrea* (Mart. Ex Tul.) L.P. Queiroz. *Libidibia ferrea* é uma espécie arbórea nativa do Brasil, conhecida popularmente como jucá ou pau-ferro, que ocorre no leste e nordeste do Brasil, em florestas estacionais secas e na Caatinga. A espécie, particularmente, apresenta variações morfológicas complexas e difíceis de interpretar, com muitos intermediários entre ela e outras espécies afins (QUEIROZ, 2009). Trata-se de uma espécie autopoliplóide, com indivíduos diploides ($2n= 24$) e indivíduos

tetraploides ($2n= 48$) (BELTRÃO & GUERRA, 1990). Além disso, apresenta isolamento reprodutivo pós-zigótico entre os citótipos e quebra da autoincompatibilidade em indivíduos tetraploides.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Poliploidia

A poliploidia pode ser definida como um processo de multiplicação do genoma em três ou mais conjuntos completos de cromossomos (RAMSEY & SCHEMSKE, 1998) e, embora seja raro em grupos animais (OTTO & WHITTON, 2000), a poliploidia é comum em plantas (SOLTIS et al., 2004). Além disso, tem sido considerado um importante mecanismo de evolução e especiação, conhecido como um dos poucos capazes de atuar em simpatria (SOLTIS et al., 2007).

Diversos trabalhos vêm tentando estimar a taxa de poliploidia em plantas. De acordo com Masterson (1994), a ocorrência de poliploidia varia de 30 a 70% em angiospermas e esse valor se aproxima da totalidade em pteridófitas (GRANT, 1981). Entretanto, estimativas recentes mostram que esses valores são maiores do que antes se assumia. Jiao et al. (2011) apontaram dois eventos de poliploidia em linhagens ancestrais, um pouco antes da diversificação das plantas com sementes e outro antes da diversificação das angiospermas. A partir desses resultados puderam concluir que todas as plantas passaram por pelo menos um evento de poliploidia ao longo de sua história evolutiva e este pode ter contribuído para a grande diversificação das plantas com sementes e com flor.

Diversos mecanismos citológicos podem induzir a poliploidia em plantas, como a duplicação de células somáticas e a formação de gametas não reduzidos (RAMSEY & SCHEMSKE, 1998). A duplicação das células somáticas pode ocorrer durante o ciclo de vida das plantas e resulta em células meristemáticas poliploides que podem originar um organismo novo poliploide (TAYALÉ & PARISOD, 2013). Por outro lado, durante o ciclo reprodutivo pode ocorrer a formação de gametas não reduzidos. Nesse processo, os gametas oriundos de indivíduos diploides contêm o número completo de cromossomos somáticos ($2n$) e a união de gametas reduzidos e não reduzidos, ou de dois gametas não reduzidos, resultará em embriões poliploides (RAMSEY & SCHEMSKE, 1998).

O genoma duplicado desses indivíduos poliploides apresenta natureza altamente mutável e dinâmica (SOLTIS & SOLTIS, 2012), podendo passar por intensa reorganização, a qual envolve reestruturação e alterações funcionais que, em conjunto com a poliploidia, é comumente referida como disploidização (SOLTIS & SOLTIS, 2012; TAYALÉ & PARISOD, 2013). Através desse processo, restaura-se a condição diploide dos genomas duplicados. Dessa maneira, indivíduos poliploides podem ser classificados temporalmente em paleopoliploides, antigos poliploides com genomas disploidizados, ou neopoliploides, jovens

poliploides com genomas duplicados (TAYALÉ & PARISOD, 2013). Quanto à origem, indivíduos poliploides podem ainda ser classificados em autopoliploides, quando surgem pela duplicação de um mesmo genoma, ou alopoliploides, quando originados pela duplicação de genomas distintos, normalmente após um evento de hibridização (STEBBINS, 1971).

2.2 Evolução e poliploidia

Uma das mais importantes implicações da poliploidia na evolução é a criação de novas espécies (SOLTIS & SOLTIS, 2012). As mudanças genéticas causadas por essa multiplicação genômica tornam-se persistentes devido à incompatibilidade gerada entre os indivíduos diploides e seus descendentes poliploides, isolando-os reprodutivamente (LEVIN, 1983; HUSBAND & SABARA, 2003). É por esta razão que a poliploidia é frequentemente considerada como um dos poucos mecanismos capazes de atuar em simpatria (SOLTIS et al., 2007).

Além da incompatibilidade gerada, outra alteração comum em indivíduos poliploides é a quebra da autoincompatibilidade (LEVIN, 1983; LEVIN, 2002; BARRINGER, 2007). Como exemplo, podemos citar o estudo de Barringer (2007). Utilizando banco de dados com taxas de fecundação naturais para 235 espécies de angiospermas, o autor encontrou índices maiores de autofecundação em indivíduos poliploides quando comparados a seus progenitores, para quase a totalidade das espécies analisadas.

Como afeta todo o conjunto genômico, além da incompatibilidade e quebra da autoincompatibilidade, diversas mudanças bioquímicas, fisiológicas, fenotípicas e no desenvolvimento ocorrem em indivíduos poliploides, podendo conferir capacidade de adaptação a novas condições ambientais (LEVIN, 1983; RAMSEY & SCHEMSKE, 1998). Como revisando por Petit et al (1999), resultados sugerem que a poliploidia aumenta a capacidade de colonização de novos nichos e podem, dessa forma, se estabelecer em áreas onde seus progenitores eram ausentes. Nesse contexto, a poliploidia pode ser considerada uma excelente estratégia adaptativa que impulsiona a ocupação de novos nichos ecológicos através das modificações que proporciona (REISEMBERG & WILLIS, 2008).

2.3 Distribuição dos poliploides e mecanismos de isolamento pré-zigóticos

Indivíduos poliploides geralmente são encontrados separados espacialmente de seus progenitores diploides, mas podem, eventualmente, ocorrer em simpatria com indivíduos diploides, originando populações mistas (LEWIS, 1980; DIJK & BAKX-SCHOTMAN, 1997; HUSBAND & SCHEMSKE, 1998; PETIT et al, 1999). Como exemplo dessa variação

geográfica temos a distribuição de *Chamerion angustifolium* (Onagraceae), para a qual, de modo geral, populações diploides são encontradas em altitudes mais elevadas que as tetraploides, e ambas coocorrem numa estreita zona (5 km); mesmo nessa área de contato, indivíduos diploides foram encontrados em locais com altitudes sutilmente maiores (HUSBAND & SCHEMSKE, 1998).

Existem dois caminhos para a formação dessas zonas mistas. O primeiro ocorre quando um neopoliploide surge a partir de uma população diploide, e o segundo ocorre através do contato secundário entre populações diploides e poliploides que evoluíram em alopatria (PETIT et al., 1999). No que se refere à neopoliploides, seu estabelecimento dependerá da capacidade de manutenção da população durante sucessivas gerações ou a rápida colonização de novas áreas (RAMSEY & SCHEMSKE, 1998; PETIT et al., 1999). Diversos modelos teóricos tentam explicar as circunstâncias ecológicas e genéticas que regem as interações entre diploides e tetraploides em populações mistas (LEVIN, 1975; FELBER, 1991; RODRIGUEZ, 1996). Um dos mais discutidos é o “modelo da exclusão do citótipo em minoria”, proposto por Levin (1975). O cruzamento de indivíduos diploides e poliploides pode gerar indivíduos triploides, que são inviáveis ou estéreis. De acordo com esse pressuposto, o modelo afirma que o citótipo em minoria fica mais propenso ao recebimento de pólen do citótipo em maioria, uma alta frequência desses cruzamentos pode resultar em menor sucesso reprodutivo e um conseqüente decréscimo populacional do citótipo em minoria. Na ausência de produção contínua de indivíduos do citótipo em minoria, essa seleção impedirá a coexistência de diploides e poliploides em simpatria.

Como forma de reduzir a força de desvantagem agindo sobre o citótipo em minoria, populações mistas são frequentemente encontradas desenvolvendo diferentes mecanismos de isolamento reprodutivo pré-zigóticos (PETIT et al., 1996; HUSBAND & SABARA, 2003). Dentre estes mecanismos podemos destacar a fenologia (com diferenças na floração dos diferentes citótipos), fidelidade do polinizador e mudanças na atratividade floral. Como exemplo de assincronia na floração em diferentes níveis de ploidia, um estudo realizado por Husband & Schemske (2000) em populações mistas de *Chamerion angustifolium* (Onagraceae), em estufa e em ambiente natural, constatou que populações tetraploides iniciavam sua floração com um atraso de dez dias quando comparadas às populações diploides, o que poderia contribuir para a diminuição do fluxo de pólen entre os citótipos.

Além de atrasos ou avanços fenológicos, variações na morfologia floral de indivíduos poliploides também são encontradas, e, em resposta a essa variação, novas interações com insetos visitantes podem ser criadas, alterando padrões de fluxo gênico, promovendo, dessa

forma, a separação de nicho e o isolamento dos citótipos (SEGRAVES & THOMPSON, 1999; THOMPSON et al., 2004). Mudanças na atratividade floral foram encontradas entre tetraploides e octaploides, da espécie *Gymnadenia conopsea* (Orchidaceae) (JERSÁKOVÁ et al., 2010). Além de parâmetros morfológicos distintos, o odor e o padrão de reflexão UV produzido por flores dos diferentes níveis de ploidia se mostraram significativamente distintos. Apesar disso, flores de ambos os citótipos foram visitadas pelos mesmos grupos de polinizadores (esfingídeos e outros animais noturnos), que não demonstraram preferência por nenhum citótipo.

Em contrapartida, Segraves & Thompson (1999), estudando populações diploides e autotetraploides de *Heuchera grossulariifolia* (Saxifragaceae), demonstraram a ocorrência de diferenças morfológicas nas flores dos dois citótipos da espécie, e esse padrão pareceu influenciar na assembleia de visitantes. Os autores analisaram os visitantes florais de uma população natural mista e observaram que os citótipos diferiram com relação ao conjunto de visitantes e que seis das 15 espécies de visitantes florais comuns a ambos visitaram preferencialmente um dos citótipos. Além de diferenças na frequência de visitas, o comportamento do polinizador também pode contribuir para o isolamento dos citótipos, como observado para a espécie *Chamerion angustifolium* (Onagraceae), onde simulações mostraram uma baixa frequência de voos das abelhas entre flores dos diferentes níveis de ploidia, com forrageamento preferencial em apenas um citótipo (HUSBAND & SCHEMSKE, 2000).

Assim, diferenças na assembléia de polinizadores podem reduzir a fertilização cruzada entre indivíduos de diferentes níveis de ploidia, o que evita o aparecimento de indivíduos estéreis e ainda contribui para o isolamento reprodutivo dos citótipos (SEGRAVES & THOMPSON, 1999).

Outra condição que poderia promover a separação de nicho entre os níveis de ploidia seria a deposição de pólen diferencial por diploides e tetraploides no corpo dos polinizadores, sobretudo para aquelas espécies com diferenças na morfologia floral, como diferenças na plataforma de pouso (BORGES et al., 2012). Embora essas barreiras venham sendo largamente reconhecidas como imprescindíveis para a coexistência e estabelecimento de uma nova linhagem (GRANT, 1992), estudos com enfoque no papel do isolamento reprodutivo por fatores pré-zigóticos, têm sido alvo de poucos estudos (HUSBAND & SABARA, 2003; KENEDY et al., 2006; JERSAKOVA et al., 2010), a grande maioria destes estão concentrados em fatores pós-zigóticos.

2.4 Espécie modelo

Libidibia (DC.) Schltl é um gênero neotropical segregado de *Caesalpinia*, com seis a oito espécies de árvores e arbustos que ocorrem principalmente em florestas estacionais secas (Lewis 2005). Em estudo recente, Queiroz (2009) propôs uma nova combinação da única espécie do gênero nativa do Brasil, *Libidibia ferrea* (Mart. Ex Tul.) L.P. Queiroz., conhecida popularmente como jucá ou pau-ferro, a espécie ocorre no leste e nordeste do país, em florestas estacionais secas e na Caatinga (QUEIROZ, 2009). *Libidibia ferrea*, particularmente, apresenta variações morfológicas complexas e difíceis de interpretar, com muitos intermediários entre ela e outras espécies afins (QUEIROZ, 2009).

De acordo com estudo realizado por Beltrão & Guerra (1990), esta espécie apresenta indivíduos diploides ($2n = 24$) e indivíduos tetraploides ($2n = 48$) e, baseados em características cariotípicas similares, os autores sugeriram ser um caso de autopoliploidia. A poliploidia encontrada na espécie pode ser a causa da grande variação morfológica existente em *L. ferrea*, sendo encontradas quatro variedades: 1) *Libidibia ferrea* var. *ferrea*, 2) *L. ferrea* var. *glabrescens*, 3) *L. ferrea* var. *leiostachya* e 4) *L. ferrea* var. *parvifolia* (Queiroz 2009). Em estudo recente, Borges et al. (2012), analisando material de herbário, encontraram indivíduos diploides encaixando-se na descrição de *L. ferrea* var. *parvifolia*, e indivíduos tetraploides encaixando-se nas descrições de *Libidibia ferrea* var. *ferrea* e *L. ferrea* var. *glabrescens*. Ainda nesse estudo, os autores constataram isolamento reprodutivo pós-zigótico entre os citótipos, aumento de tamanho nas flores tetraploides e quebra da autoincompatibilidade genética em indivíduos tetraploides.

3. MANUSCRITO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO PLANT SYSTEMATICS AND
EVOLUTION

FENOLOGIA, ATRIBUTOS FLORAIS E FLUXO POLÍNICO ENTRE CITÓTIPOS
DIPLOIDES E TETRAPLOIDES DE *LIBIDIBIA FERREA* (LEGUMINOSAE)
OCORRENTES EM SIMPATRIA

Isabelle Fernandes de Albuquerque¹ Laís Angélica Borges² & Ariadna Valentina Lopes^{3*}

¹Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Botânica, Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal. isabellealbuquerque@hotmail.com

²Universidade Federal da Paraíba, Departamento de Ciências Biológicas. lais@cca.ufpb.br

³Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Botânica, Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal. avlopes@ufpe.br

*Autor para correspondência

RESUMO

A poliploidia é conhecida como um dos poucos processos de especiação capazes de atuar em simpatria. Modelos teóricos tentam explicar as circunstâncias ecológicas e genéticas que regem as interações entre diploides e tetraploides em populações mistas, como o “modelo da exclusão do citótipo em minoria”, segundo o qual poliploides ficam em desvantagem nessas zonas, que levam a sua exclusão. Mecanismos de isolamento pré-zigótico podem ser encontrados em populações mistas como forma de contrariar a força do modelo e permitir o estabelecimento da linhagem poliploide. Esse trabalho teve como objetivo investigar a ocorrência de isolamento reprodutivo pré-zigótico entre diferentes citótipos de *Libidibia ferrea* (Leguminosae) localizados em populações mistas. Foram realizadas observações sobre a fenologia, atributos florais, fluxo polínico, polinizadores e frequência de visitas nos citótipos diploides e tetraploides da espécie. Indivíduos de ambos citótipos floresceram durante o mesmo período, embora com intensidades diferentes. Quanto aos atributos florais, tetraploides apresentaram flores significativamente maiores, incluindo tamanho dos grãos de pólen, que os diploides. Os citótipos compartilham, de um modo geral, a assembleia de polinizadores, havendo, entretanto, diferença sutil quanto à deposição de pólen no corpo deles, dependendo de qual citótipo visitam, e quanto ao número de espécies de polinizadores, maior em tetraploides. Além disso, a frequência de visitas dos polinizadores comuns aos dois citótipos foi significativamente maior no tetraploide. Apesar das diferenças nos locais de deposição de pólen no corpo dos polinizadores comuns aos dois citótipos, ocorreu discreto fluxo polínico e bastante diferencial entre os citótipos: apenas 50% dos estigmas diploides continham no máximo 8,8% de grãos tetraploides; apenas 50% dos estigmas tetraploides continham no máximo 4,8% de grãos diploides. Estes resultados indicam que existiu forrageamento preferencial pelos polinizadores, o que pode ter contribuído para minimizar o fluxo polínico entre os citótipos, sendo esta a principal barreira pré-zigótica em *L. ferrea*.

Palavras chave: Fluxo de pólen; Leguminosae; Mecanismos pré-zigóticos; Multiplicação genômica; Poliploidia; Polinização.

INTRODUÇÃO

A multiplicação do genoma em três ou mais conjuntos completos de cromossomos, definida como poliploidia, é considerada uma das formas de especiação mais comuns em angiospermas (Ramsey & Schemske 1998). A partir desse único evento genético, mudanças geradas podem persistir devido à incompatibilidade genética existente entre poliploides e seus progenitores diploides (Husband & Sabara 2003). Por esta razão, a multiplicação genômica é conhecida como um dos poucos processos de especiação capazes de atuar em simpatria (Soltis et al. 2007).

Diversos modelos teóricos tentam explicar as circunstâncias ecológicas e genéticas que regem as interações entre diploides e tetraploides em populações mistas (e.g. Levin 1975; Felber 1991; Rodriguez 1996). Um dos mais discutidos é o “Modelo da Exclusão do Citótipo em Minoria”, proposto por Levin (1975). De acordo com esse modelo, os novos poliploides formados ficariam em desvantagem, porque estão mais propensos ao recebimento de pólen do citótipo em maioria, e esse cruzamento geraria indivíduos triploides, que são inviáveis ou estéreis, reduzindo, portanto, o sucesso reprodutivo dos poliploides.

A fim de permitir o estabelecimento e coexistência com seus progenitores, populações mistas vêm sendo encontradas desenvolvendo vários mecanismos de isolamento pré-zigóticos, tais como: : 1) assincronia de floração, 2) fidelidade do polinizador, 3) mudanças na atratividade floral (Petit et al. 1997; Husband & Schemske 2000; Husband & Sabara 2003). Entretanto, poucos estudos têm explorado essas barreiras reprodutivas existentes entre poliploides com seus progenitores diploides e feito associações ao estabelecimento da nova linhagem poliploide (Husband & Sabara 2004). Em estudo sistemático com a espécie *Chamerion angustifolium* (Onagraceae), os referidos autores demonstraram a importância de barreiras pré-zigóticas no isolamento reprodutivo entre citótipos da espécie, as quais representaram 96,7% do isolamento reprodutivo total, sendo as barreiras mais representativas

a fidelidade do polinizador (44%) e o isolamento geográfico (41%). Dessa forma, estudos dessa natureza são de fundamental importância para entender as forças que regem a viabilidade e a fertilidade entre diferentes citótipos, bem como a regulação e o estabelecimento de indivíduos poliploides.

O presente estudo teve por objetivo verificar a ocorrência de barreiras pré-zigóticas em população mista da espécie arbórea *Libidibia ferrea* (Mart. Ex Tul.) L.P. Queiroz (Leguminosae – Caesalpinioideae). *Libidibia ferrea* é uma espécie arbórea nativa do Brasil (Queiroz 2009), conhecida popularmente como jucá ou pau-ferro, que ocorre no leste e nordeste do Brasil, em florestas estacionais secas e na Caatinga. A espécie, particularmente, apresenta variações morfológicas complexas e difíceis de interpretar, com muitos intermediários entre ela e outras espécies afins (Queiroz 2009). Trata-se de uma espécie autoploide, com indivíduos diploides ($2n = 24$) e indivíduos tetraploides ($2n = 48$) (Beltrão & Guerra 1990). Além disso, apresenta isolamento reprodutivo pós-zigótico entre os citótipos e quebra da autoincompatibilidade genética em indivíduos tetraploides (Borges et al. 2012).

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

O presente estudo foi realizado em uma população mista de *L. ferrea* localizada no município de Poção (08°11'S, 36°42'O), Pernambuco. Os indivíduos diploides encontrados foram descritos como *L. ferrea* var. *parvifolia*, enquanto alguns tetraploides encaixam-se na descrição de *L. ferrea* var. *ferrea* e outros na de *L. ferrea* var. *glabrescens*. O município escolhido encontra-se inserido no maciço da Borborema com cerca de 1030 m a.n.m, que, por sua elevada disposição geográfica, apresenta clima com temperaturas amenas e maior umidade, o que reflete na vegetação (Araújo-Filho et al. 2000). Em Poção existem tanto áreas

de Caatinga Hipoxerófila, quanto Brejos de Altitude, e, embora a vegetação local seja bastante alterada, especialmente para a obtenção de lenha e criação da pecuária (Araújo-Filho et al. 2000). Este estudo foi realizado em área de caatinga onde é possível avistar vários indivíduos de *L. ferrea* nas pastagens, uma vez que a espécie é mantida por prover sombra e forragem para o gado. A área apresenta baixos índices de precipitação pluviométrica (735 mm), com padrão claramente sazonal, com duas estações bem definidas, uma seca (agosto a dezembro) e outra chuvosa (janeiro a julho) (LAMEPE 2010).

Nível de ploidia e fenologia

Observações a cerca da fenologia foram iniciadas em junho/2012. Para acompanhamento fenológico foram inicialmente marcados dez indivíduos diploides e cinco indivíduos tetraploides. A partir de janeiro/2013 três novos indivíduos tetraploides foram encontrados e marcados para acompanhamento fenológico, totalizando, dessa forma, dez indivíduos diploides e oito indivíduos tetraploides. O nível de ploidia desses indivíduos foi mensurado utilizando-se folhas jovens, no qual foi preparada uma suspensão de núcleos, seguindo a metodologia descrita por Loureiro et al. (2007), utilizando tampão WPB. Após esse procedimento, o nível de ploidia das amostras foi estimado através do citômetro CyFlow SL flow (Partec, Görlitz, Germany). O *software* FloMax (Partec) foi usado para o processamento dos dados.

Foram realizadas excursões mensais durante 16 meses, no período de junho/2012 a dezembro/2013, para acompanhamento da fenologia da floração e frutificação. Durante a época de floração da espécie, visitas quinzenais foram realizadas. Para estimar a intensidade de botões florais, flores e frutos, foram feitas observações sob a copa das árvores e atribuídos valores percentuais. Esses valores foram classificados em categorias (0-4), com intervalos de 25% entre as categorias, essa estimativa de intensidade foi feita para cada uma das fenofases

(Fournier 1974). O padrão de floração da espécie foi determinado de acordo com classificação proposta por Newstrom et al. (1994). Além disso, foi estimada a sincronia dos eventos fenológicos dentro e entre as populações dos diferentes citótipos de acordo com índice proposto por Freitas & Bolmgren (2008).

Atributos florais e fluxo polínico

Foram realizadas observações sobre a longevidade da antese floral, receptividade do estigma e período funcional dos estames em indivíduos diploides e tetraploides. Botões em pré-antese de indivíduos de ambos os citótipos foram marcados no campo e acompanhados quanto à duração e sequência de antese. A receptividade estigmática e a abertura das anteras foram observadas no início da antese floral, analisadas de hora em hora até a obtenção de resposta positiva. Para verificar a receptividade do estigma, foram coletados pistilos de cinco flores/citótipo/hora, oriundos de três indivíduos diferentes, tendo sido as flores e previamente ensacadas. Os pistilos foram então mergulhados, em solução 0,25% de permanganato de potássio (KMnO_4), sendo observada, após cinco minutos, a ocorrência de coloração ou não da área estigmática (Robinson 1924). As anteras foram observadas focalmente.

Foram coletadas 30 flores/citótipo para observações acerca da morfologia floral. Os seguintes parâmetros foram mensurados: 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 a plataforma de pouso das abelhas durante as visitas, 4) diâmetro do ovário e 5) área do nectário. Como a espécie produz néctar em volume inferior a $0,1\mu\text{l}$, medições com microseringa e posterior análise no refratômetro para aferir a concentração de açúcar não foram possíveis. Dessa maneira, a área do nectário de indivíduos diploides e tetraploides foram medidas, em laboratório, com o auxílio de um paquímetro digital. A área do nectário

tem o formato semelhante a uma meia esfera. Assim, o diâmetro foi medido e o valor do volume da esfera foi calculado. Em campo foi ainda estimado o número de flores por inflorescência em 20 inflorescências/citótipo e o número de flores abertas por dia em 30 inflorescências/citótipo.

Botões em pré-antese foram coletados e fixados em álcool 70% para realização da contagem de grãos de pólen e óvulos e a morfometria dos grãos de pólen. A razão pólen/óvulo (Cruden 1977) foi estimada contando-se o número de grãos de pólen e de óvulos por botão (n=10 botões/citótipo; cinco indivíduos). Para cada botão, contou-se o pólen de três anteras com auxílio de contador manual e lâmina quadriculada; Após isso, uma média com os valores encontrados foi calculada, multiplicou-se essa média pelo número de anteras presentes na flor e dividiu-se pelo número de óvulos presentes. Para a morfometria dos grãos de pólen utilizou-se microscópio óptico com auxílio de uma ocular micrométrica, sendo medidos o diâmetro equatorial de 400 grãos por citótipo, utilizando-se flores oriundas de cinco indivíduos/citótipo.

Para verificar e quantificar a existência de fluxo polínico entre os citotipos, foram coletadas 30 flores/citótipo sob condições naturais, no final da antese, as quais tiveram seus estigmas analisados em laboratório para contagem e morfometria dos grãos de pólen presentes.

Visitantes florais

Foram realizadas observações focais em cinco indivíduos/citótipo acerca da frequência e comportamento dos animais visitantes, recurso floral procurado e resultado da visita (polinização ou pilhagem) nas flores. . Para obtenção dos dados de frequência, foram realizadas observações durante todo o período de antese floral, em intervalos de trinta minutos. Os visitantes foram classificados como: polinizadores efetivos (quando sempre

contataram ambas as partes reprodutivas das flores durante as visitas), polinizadores ocasionais (quando nem sempre contataram ambas as partes reprodutivas das flores) ou pilhadores (quando nunca contataram as partes reprodutivas das flores ou contataram sempre uma das partes apenas, i.e. não atuarem como polinizadores).

Alguns espécimes dos insetos visitantes às flores foram capturados com auxílio de rede entomológica, sacrificados com acetato de etila, montados a seco, identificados e depositados na coleção do Laboratório de Biologia Floral e Reprodutiva (POLINIZAR) da UFPE como espécimes-testemunho. Polinizadores efetivos de ambos os citótipos foram coletados com auxílio de puçá e analisados em campo sobre a deposição do pólen em seu corpo.

Análise dos dados

Para análise dos dados fenológicos, primeiramente foi calculado o percentual de intensidade de Fournier (1974) para cada fenofase. Em cada mês fez-se a soma das categorias encontradas para todos os indivíduos e dividiu-se pelo valor máximo possível (número de indivíduos multiplicado por 4). Feito isso, multiplicou-se o valor obtido por 100 a fim de transforma-lo em um valor percentual. A porcentagem de indivíduos manifestando determinada fenofase foi calculada de maneira simples, apenas com dados de presença e ausência.

A fim de mensurar a sincronia de floração dentro e entre os citótipos da população, o índice de Freitas & Bolmgren (2008), foi calculado. Esse índice inclui a duração e a intensidade de determinada fenofase no intervalo de tempo estudado, por isso, estima com maior robustez a sincronia fenológica. Calculamos o índice para a fenofase floração. Para tal, foi utilizada a seguinte equação:

$$d_i = \frac{1}{T_i} \frac{1}{N-1} \sum_{j=1}^N \sum_{t=1}^T \sqrt{f_{i,t} f_{j,t}} , j \neq i$$

Onde d_i corresponde ao nível de sincronia para o indivíduo (i) em relação à população de indivíduos utilizados nos censos j ; f é o valor da intensidade de fenofase (0 a 1); T_i é o número total de censos onde $f_i > 0$; N corresponde ao número total de indivíduos na população estudada; j é o indivíduo na população; t é número de ordem do censo; T é o número total de censos ao longo do tempo para a população estudada quando $f_j > 0$. Calculou-se o d_i de cada indivíduo na população para em seguida estimar o valor de S (nível de sincronia na população), somando-se os valores de d_i de todos os indivíduos e dividindo pelo número total de indivíduos. Os valores variam de 0 a 1 e quanto mais próximos de 1, maior é a sincronia entre os indivíduos analisados.

Para verificar a existência de diferenças significativas entre os dois citótipos com relação a parâmetros da morfometria floral, razão P/O, número de flores abertas por dia e número de flores por inflorescência foi utilizado teste-t. Os pressupostos para a realização dos testes foram previamente testados; a normalidade dos dados foi testada utilizando o teste de Shapiro-Wilk. Para verificar se existem diferenças entre o tamanho dos grãos de pólen dos diferentes citótipos foi utilizado o teste não paramétrico de Wilcoxon-Mann-Whitney. Essas análises estatísticas estão descritas em Zar (1999) e foram realizadas utilizando-se o software BioEstat 5.0 com nível de significância igual a 0,05.

Por fim, para verificar a existência de diferenças na frequência de visitas nas inflorescências dos dois citótipos foi realizado um teste qui-quadrado. O mesmo teste foi utilizado para verificar a existência de diferenças na frequência de visitas às flores por polinizadores efetivos de ambos os citótipos.

RESULTADOS

Fenologia reprodutiva

Os indivíduos de ambos os citótipos da espécie *Libidibia ferrea* localizados na população mista apresentaram padrão de floração anual de acordo com a classificação proposta por Newstrom et al. (1994). No ano de 2012, indivíduos tetraploides emitiram seus botões em junho e outubro, fenofase com baixa porcentagem de indivíduos (Fig. 1A) e baixa intensidade (Fig. 1B), quando diploides não apresentavam essa fenofase (Fig. 1A). Esse comportamento, entretanto, não foi repetido nos mesmos meses do ano consecutivo (Fig. 1A). A partir de nov/2012, pode-se observar a emissão de botões florais em ambos os citótipos se estendendo até março/2013 (Fig. 1A). A intensidade de botões atingiu seu máximo na segunda quinzena de dezembro para indivíduos diploides (35%) e na segunda quinzena de janeiro para indivíduos tetraploides (53%) (Fig. 2A).

De maneira semelhante à emissão de botões, ambos os citótipos floresceram juntos por aproximadamente quatro meses, de novembro a março/2012, e esse padrão pareceu se repetir no ano seguinte (Fig. 1B). A intensidade de floração dos indivíduos diploides parece aumentar no decorrer dos meses, atingindo seu pico na primeira quinzena de janeiro (40%), decrescendo gradualmente até março (Fig. 2B). Em contrapartida, indivíduos tetraploides apresentaram padrão de intensidade irregular, onde o pico de intensidade foi atingido na primeira quinzena de fevereiro (37%) (Fig. 2B). Quando comparamos tanto a porcentagem de indivíduos como a intensidade de floração no decorrer dos meses, indivíduos diploides apresentam valores maiores para ambos os parâmetros na maior parte do período de floração (Fig. 2A-B); a partir da segunda quinzena de janeiro, indivíduos tetraploides superaram indivíduos diploides, embora essas diferenças tenham sido sutis (Fig. 2A-B). Dessa forma, apesar dos citótipos florescerem no mesmo período, a porcentagem de indivíduos com flor e

sua intensidade apresentaram diferenças, com valores maiores em indivíduos diplóides (Fig. 2A-B).

Indivíduos de ambos os citótipos em fase de frutos verdes foram encontrados nos 12 meses do primeiro ano de estudo, de junho/2012 a maio/2013; nos meses de outubro, novembro e dezembro/2013, essa fenofase esteve ausente para indivíduos diploides e tetraploides (Fig. 1C). Em março/2012, a intensidade de frutos verdes foi maior tanto em indivíduos diploides (70 %) como em indivíduos tetraploides (63%), sendo ausentes indivíduos com frutos maduros (Fig. 1C). A partir do mês consecutivo, abril/2012, a porcentagem e a intensidade de indivíduos para a fenofase frutos maduros aumentou gradualmente, atingindo seu pico em setembro/2012 (Fig. 1D e Fig. 2D), à medida que a quantidade e intensidade de indivíduos com frutos verdes diminuiu (Fig. 1C e Fig. 2C). Assim, no período entre abril/2012 e setembro/2012 ocorreu a maturação dos frutos da espécie. A partir de setembro/2012, mês no qual ocorreu o pico de intensidade e quantidade de indivíduos com frutos maduros, a quantidade e intensidade desses frutos começaram a diminuir gradativamente até dezembro/2012 (Fig. 1D e Fig. 2D). Esse foi o período no qual ocorre a dispersão dos frutos da espécie.

Apesar de indivíduos diploides e tetraploides apresentarem sobreposição no período de floração, os resultados do índice de sincronia calculado indicaram pouca sincronia dentro e entre os citótipos da população. Indivíduos diploides apresentaram índice de sincronia (S) igual a 0.451, de um valor que pode variar de 0 a 1. Com índices ainda mais baixos, indivíduos tetraploides apresentaram $S = 0.181$. Quando a população foi analisada como um todo, incluindo indivíduos de ambos os níveis de ploidia, o resultado foi $S = 0.274$.

Atributos florais

Os dois citótipos apresentam inflorescências do tipo panícula e as flores são hermafroditas, pentâmeras e zigomorfas, do tipo estandarte (sensu Faegri & Pijl, 1979). A corola é amarela, havendo pequenas máculas vermelhas na metade inferior da pétala estandarte, constituindo o guia de néctar. Apresentam dez estames, anteras de deiscência longitudinal que circulam o estilete e estão dispostos em duas séries, uma mais interna e uma mais externa. Os estames são muito próximos uns dos outros, apresentam densa pilosidade e assim, 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 (Tabela 1), 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.

O período de antese dos indivíduos diploides e tetraploides se sobrepõe, sendo esta diurna, com duração de 12 horas. A receptividade estigmática e o período de abertura das anteras também não diferiram entre os dois citótipos. As flores, com o estigma já receptivo, começam a abrir às 05:00, estando completamente abertas por volta das 06:30. A partir das 07:30, as anteras iniciam a sua abertura, estando completamente abertas às 09:00h. No final da tarde (18:00h) a pétala estandarte começa a curvar-se em direção ao centro da flor e, em seguida, as outras pétalas fecham-se envolvendo o androceu.

Para todos os parâmetros analisados, flores de tetraploides apresentaram-se significativamente maiores quando comparadas às de diploides (Tabela 1). De maneira semelhante, o número de flores por inflorescência foi significativamente maior em indivíduos

tetraploides ($P < 0.0001$), com indivíduos diploides apresentando média de 169.1 flores por inflorescência e tetraploides com 377.1 flores por inflorescência (Tabela 2). Em contrapartida, o número de flores abertas por dia não diferiu significativamente entre os citótipos ($p = 0.736$) (Tabela 2). Foram encontradas, nas flores tetraploides, sempre 10 óvulos por flor, enquanto nas diploides esse número variou entre 6 e 10. A razão P/O para os dois citótipos não diferiu significativamente ($p = 0,833$), sendo ambos classificados como xenógamos facultativos.

No que se refere à morfometria dos grãos de pólen, indivíduos tetraploides apresentaram grãos significativamente maiores ($9.568 \mu\text{m}$) quando comparados a indivíduos diploides ($7.656 \mu\text{m}$) ($p < 0.001$) (Tabela 2). Foi verificada a ocorrência de relativo fluxo de pólen entre os citótipos da espécie. Da totalidade de estigmas analisados, 15 estigmas diploides foram encontrados com grãos de pólen tetraploides depositados e 13 estigmas tetraploides com grãos tetraploides presentes. Entretanto, os grãos de pólen estiveram depositados em maiores quantidades, nos estigmas no qual foram oriundos (Fig. 5). Em estigmas diploides, 91,2 % do pólen depositado era do mesmo citótipo, de maneira similar 95,2% do pólen encontrado em estigmas tetraploides era oriundo do mesmo citótipo.

Visitantes florais e frequência de visitas

Indivíduos diploides e tetraploides localizados na população mista de *L. ferrea* compartilharam suas assembleias de polinizadores. Ambos tiveram suas flores visitadas por abelhas, borboletas e beija-flor. Entretanto, o número de espécies de visitantes dos dois citótipos diferiu (Tabela 3). Os visitantes encontrados foram as abelhas *Apis mellifera*, *Centris* sp.1, *Centris* sp.2, *Trigona* sp., *Xylocopa frontalis*, *X. grisescens* e *Xylocopa* sp., as duas últimas sendo observadas visitando apenas indivíduos tetraploides, e o beija-flor *Chlorostilbon aureoventris* (visitando ambos os citótipos; Tabela 3). Foram ainda observadas três espécies de Lepidoptera e duas espécies de Hymenoptera visitando ocasionalmente as

flores de ambos os citótipos (Tabela 3). Dentre todos os visitantes encontrados, o mais frequente para ambos os citótipos foram as abelhas do gênero *Centris*, com 36,8% do total de visitas no citótipo diploide e 63,6% em tetraploides.

Os polinizadores efetivos de ambos os citótipos foram abelhas de médio a grande porte ($\geq 12\text{mm}$) dos gêneros *Centris* e *Xylocopa*, as quais procuravam a flor em busca de néctar (Tabela 3). As espécies do gênero *Centris*, para acessarem o nectário, pousavam sobre a flor e afastavam levemente a pétala estandarte, encontrando as duas fendas do nectário. Nessa ocasião, tocavam as anteras e estigmas com a região ventral do corpo (i.e., deposição esternotribica), efetuando a polinização; entretanto em indivíduos que visitavam o citótipo tetraploide os grãos de pólen foram depositados próximo ao primeiro par de pernas enquanto nas visitas ao citótipo diploide a deposição era próxima ao segundo par de pernas, não havendo, dessa forma, contato de um com o outro. Apesar do semelhante comportamento observado para as espécies de *Centris*, a deposição do pólen nas espécies do gênero *Xylocopa* não diferiu entre os dois citótipos. Essas abelhas “caminhavam” por toda inflorescência em busca das flores e foi encontrado pólen de *L. ferrea* em todo o ventre da abelha, inclusive nas pernas, não diferindo entre abelhas observadas nos dois citótipos.

Comportamento semelhante para ambos os citótipos foi observado para as abelhas *Apis mellifera* e *Trigona spinipes*, e o beija-flor *Chlorostilbon aureoventris*. A abelha introduzida *Apis mellifera*, foi observada procurando por néctar e pólen. Na busca por pólen, essas abelhas tocavam a antera e o estigma também com a região ventral, atuando como polinizadora efetiva; na busca por néctar, entretanto, utilizavam orifícios deixados na parte externa do cálice por outros visitantes, sem tocar as estruturas reprodutivas da flor, atuando como pilhadora, por isso, foi classificada como polinizador ocasional. A abelha *Trigona spinipes* atuava ora como pilhadora de néctar, através da perfuração externa do cálice, sem contatar as partes reprodutivas da flor, ora como polinizadora efetiva, ao coletar pólen,

contatando o estigma, por isso também foi classificada como polinizador ocasional. O beija-flor *Chlorostilbon aureoventris* foi observado nos horários iniciais da antese floral, como pilhador. Vespas e borboletas foram observadas depositando seus ovos ou pilhando flores de ambos os citótipos.

Acerca do comportamento dos visitantes foram realizadas 40h horas de observações e sob a frequência de visitas 60 horas/citótipo, totalizando 180 horas de observações. Foram registradas visitas a partir das 8 horas da manhã, coincidindo com o início de abertura das anteras, e estas se estenderam até às 16 horas (Fig. 3). A frequência de visitas aumentou gradativamente em indivíduos tetraploides, com uma pequena queda às 14:00 e seu pico de visita às 15:00, com 140 inflorescências visitadas (Fig. 3A). Indivíduos diploides tiveram seu pico de visitas às 10:00, com 120 inflorescências visitadas (Fig. 3B). De maneira geral, a frequência de visitas em indivíduos tetraploides foi significativamente maior em comparação à frequência de indivíduos diploides ($\chi^2=13.631$; g.l=1; $p=0,0022$). Para os polinizadores efetivos foi possível coletar dados para o número de flores visitadas; quando comparada a frequência de visitas, as flores de indivíduos tetraploides foram visitadas em maior frequência por polinizadores efetivos da espécie *Libidibia ferrea* ($\chi^2=16642$; g.l=1; $p<0.0001$) (Fig 4).

DISCUSSÃO

Os citótipos de *Libidibia ferrea* apresentaram sobreposição no período de floração e frutificação, apesar de diferenças na intensidade e baixa sincronia dos indivíduos com flor, sobretudo, entre os indivíduos tetraploides. Mudanças no período de floração vêm sendo encontradas em populações mistas de algumas espécies poliploides (Petit et al. 1997; Husband & Schemske 2000), em outras, o período de floração pode se sobrepor (Jersáková et al. 2010). Petit et al 1997 sugeriram que a floração de *Arrhenatherum elatius* (Poaceae)

poderia ser controlada por fatores genéticos intrínsecos da espécie; indivíduos poliploides foram encontrados iniciando sua floração antes e com duração significativamente superior a de seus progenitores, comportamento este que se repetiu em indivíduos cultivados em casa de vegetação. No presente estudo, ambos os citótipos de *L. ferrea* floresceram conjuntamente durante o período que corresponde ao final da estação seca e início da estação chuvosa. Esse comportamento é comum em espécies de regiões áridas, como apontado por Machado & Barros (1997), onde os picos de floração ocorreram em fevereiro, início da estação de chuvas. Esse comportamento pode ser reposta à fatores ambientais, sendo, dessa forma, não controlado inteiramente pela poliploidia.

Resultado semelhante ao observado para *L. ferrea*, foi encontrado por Jersáková et al. (2010) em citótipos tetraploides e octaploides de *Gymnadenia conopsea*. Os autores observaram no início da floração apenas 19% de sobreposição, o que contribuiu para a diminuição do fluxo polínico; entretanto, na floração tardia de *Gymnadenia conopsea*, 77% dos indivíduos estavam com a mesma proporção de flores abertas, o que pode aumentar o fluxo de pólen, uma vez que, os indivíduos desta espécie compartilharam os mesmo polinizadores. Apesar disso, a população mista se mantém, com indivíduos de nível de ploidia distintos, encontrados, muitas vezes, a menos de um metro de distância. Embora exista a oportunidade de hibridização entre os citótipos de *L. ferrea*, com ambos florescendo na mesma época do ano, diferenças no pico de intensidade de floração podem contribuir para minimizar o fluxo polínico, permitindo a coexistência. Além disso, o isolamento através de diferenças no atraso ou avanço de floração pode significar uma pequena porcentagem do isolamento pré-zigótico total da espécie, como apontado por Husband & Sabara (2004) para a espécie *Chamerion angustifolium*, na qual a assincronia da floração contribuiu com apenas 7,7% do isolamento total da espécie.

Indivíduos tetraploides de *L. ferrea* apresentaram maior índice de sincronia com seus progenitores, quando comparado a sincronia com seus indivíduos. Em contrapartida, indivíduos diploides se apresentaram mais sincrônicos. De acordo com Borges et al. (2012) indivíduos tetraploides de *L. ferrea* apresentaram isolamento pós-zigótico com indivíduos diplóides e quebra da autoincompatibilidade, observada nos seus progenitores. Com base na baixa sincronia encontrada aqui para indivíduos tetraploides, o que pode levar a diminuição do fluxo polínico dentro desse citótipo, podemos inferir que autofecundação pode estar contribuindo de maneira representativa para a manutenção dos indivíduos poliploides na população. De acordo com o modelo proposto por Rauch & Morgan (2005), elevadas taxas de autofecundação, aliadas à baixa endogamia em autotetraploides, podem facilitar o estabelecimento dos novos indivíduos poliploides. Em contrapartida, indivíduos diploides precisam de fertilização cruzada para a formação de seus frutos, o que parece ocorrer em *L. ferrea*, haja vista a maior sincronia entre seus indivíduos e a comprovada formação de frutos nesses indivíduos.

Os citótipos da espécie *Libidibia ferrea* apresentaram diferenças significativas na morfologia floral, com flores tetraploides significativamente maiores para todos os parâmetros analisados, e aumento na frequência de visitas total e por polinizadores efetivos. Apesar do número de flores por inflorescência também ter sido significativamente maior em indivíduos tetraploides, o número de flores abertas por dia não diferiu significativamente entre os citótipos. Flores maiores e maior número de flores abertas por dia podem contribuir para o aumento da frequência de visitas em indivíduos poliploides, como observado para a espécie *Chamerion angustifolium* (Kennedy et al. 2006); Com a frequência de visitas significativamente maior em indivíduos poliploides, os autores encontraram correlação positiva entre esses dois parâmetros e concluíram que a atratividade floral (“*display floral*”) pode contribuir para o aumento da frequência. Embora o número flores abertas por dia não

tenha diferido significativamente entre os dois citótipos de *L. ferrea*, o número de flores visitadas por polinizadores efetivos foi significativamente maior em indivíduos tetraploides. Polinizadores efetivos da espécie *L. ferrea* são abelhas que forrageiam em busca de néctar, dessa forma é possível que estas flores (que tiveram o tamanho do nectário significativamente maior) possuam mais células secretoras de néctar, o que, em conjunto com o aumento do tamanho das flores, poderia explicar a maior frequência de polinizadores em indivíduos tetraploides.

Modificações nos traços florais podem, além de criar padrões de forrageamento preferencial, gerar novas interações com insetos visitantes (Segraves & Thompson 1999; Husband & Schemske 2000). Este fato foi registrado para a espécie *Heuchera grossulariifolia* (Saxifragaceae), em que a assembleia de visitantes diferiu significativamente para diploides e tetraploides quando ambos estavam floridos simultaneamente, com 6 dos 15 visitantes comuns forrageando apenas o citótipo tetraploide. Essas diferenças podem contribuir para minimizar o fluxo polínico entre os indivíduos de níveis de ploidia distintos, permitindo a coexistência dos citótipos na população mista. Para a espécie *Libidibia ferrea*, além do forrageamento preferencial por polinizadores efetivos e visitas total, interações com novos insetos parecem ser criadas, com dois polinizadores efetivos visitando apenas o citotipo tetraploide, durante todo o período de sobreposição da floração. A fidelidade do polinizador e forrageamento preferencial dos polinizadores a um dos citótipos é uma das barreiras mais representativas do mecanismo de isolamento pré-zigótico, representando cerca de 44% do isolamento total, como apontado por Husband & Sabara (2004) para a espécie *Chamerion angustifolium*.

Para a espécie estudada, os grãos de pólen de indivíduos tetraploides se apresentaram significativamente maiores quando comparados aos grãos diploides, no entanto a razão P/O foi a mesma para ambos. Uma das implicações da poliploidia é o aumento das dimensões das

células guarda e grãos de pólen nos indivíduos com genoma duplicado, referido por Stebbins (1971) como “efeito Giga”. Esta característica pode ser uma ótima ferramenta para inferir poliploidia (Marterson 1994) e com uso potencial para estudos taxonômicos. Entretanto, com a modificação do sistema reprodutivo em indivíduos poliploides a diminuição dos grãos também podem ocorrer, como observado em espécies de *Tarasa* (Malvaceae), em que a poliploidia diminuiu o tamanho dos grãos e aumentou a razão P/O (Tate & Simpson 2004). Conforme mencionado, este comportamento não foi observado aqui para *L.ferrea*, sugerindo que o aumento dos grãos de pólen em flores de indivíduos tetraploides seja decorrência da poliploidia, podendo, este dado ser usados, em estudos futuros, como ferramenta taxonômica para a espécie.

De acordo com o modelo proposto por Levin (1975), o cruzamento entre indivíduos diploides e tetraploides pode gerar indivíduos triploides, que são inviáveis ou estéreis, reduzindo, portanto, o sucesso reprodutivo dos poliploides, agindo negativamente sobre o estabelecimento desses indivíduos. Pequeno fluxo de pólen foi confirmado para a espécie *Libidibia ferrea*, uma vez que, em estigmas de flores diploides foram encontrados grãos de pólen tetraploides, e vice-versa. Nossos resultados foram semelhantes ao único estudo de fluxo polínico entre níveis de ploidia realizado por Kennedy et al. (2006) com a espécie *Chamerion angustifolium*. Nesta espécie, cerca de 75% do pólen depositado nos estigmas era oriundo do citótipo analisado, refletindo o comportamento dos vôos das abelhas, onde 73% deles eram entre citótipos. Em *L. ferrea* foi observado que mais de 90% dos grãos de pólen depositados em um estigma era oriundo do próprio citótipo. Na espécie estudada o fluxo polínico parece ser minimizado pela maior frequência de visitas em indivíduos tetraploides e sobretudo pela deposição diferenciada no corpo das abelhas do gênero *Centris*, polinizador mais frequente de ambos os citótipos.

Diferente de padrões fenológicos encontrados para espécies poliploides, os citótipos de *L. ferrea* em população mista não apresentaram atrasos ou avanços na floração, mas sim, sobreposição durante todo o período de floração da espécie. As flores do citótipo poliploide se apresentaram maiores (sobretudo para a área do nectário), o que pode ter levado a maior frequência de visitas, em *L. ferrea*. O fluxo de pólen entre citótipos parece ser minimizado pela maior frequência de visitas ao citotipo tetraploide e deposição diferenciada do pólen no corpo do polinizador efetivo mais frequente, sendo estas as principais barreiras de isolamento reprodutivo pre-zigótico para a espécie.

AGRADECIMENTOS

À Dona Dôdori e Dona Nêga, por permitirem a realização deste trabalho em suas propriedades. À Marcela Woolley e Marcela Tomaz, pelas ajudas em campo e em laboratório. Ao Dr. Luiz Gustavo Souza e ao Laboratório de Citogenética Vegetal, pela disponibilidade e ajuda com o Citômetro de Fluxo. Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal e à CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

REFERÊNCIAS

- Araújo-Filho JC, Burgos N, Lopes OF, Silva FHBB, Medeiros LAR, Melo-Filho HFR, Parahyba RBV, Cavalcanti AC, Oliveira-Neto MB, Silva FBR, Leite AP, Santos JCP, Sousa-Neto NC, Silva AB, Luz LRQP, Lima PC, Reis RMG, Barros AHC (2000) Levantamento de Reconhecimento de Baixa e Média Intensidade dos Solos do Estado de Pernambuco. Boletim de Pesquisa 11. Embrapa Solos, Rio de Janeiro.
- Borges LA, Souza LGR, Guerra M, Machado IC, Lewis GP, Lopes AV (2012) Reproductive isolation between diploid and tetraploid cytotypes of *Libidibia ferrea* (= *Caesalpinia ferrea*) (Leguminosae): ecological and taxonomic implications. Plant Systematics and

Evolution, Published online: 05 May 2012 Published online: 05 May 2012 (DOI: 10.1007/s00606-012-0643-3).

Cruden RW (1977) Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution* 31: 32-46.

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.

Fournier LA (1974) Un metodo cuantitativo para la medición de características fenológicas en arboles. *Turrialba* 24: 422-424.

Freitas L, Bolmgren K (2008) Synchrony is more than overlap: measuring phenological synchronization considering time length and intensity. *Revista Brasileira de Botânica* 31 (4): 721-724.

Husband BC, Sabara H (2004) Reproductive isolation between autotetraploids and their diploid progenitors in fireweed, *Chamerion angustifolium* (Onagraceae). *New Phytologist* 161: 703–713.

Husband BC, Schemske DW (2000) Ecological mechanisms of reproductive isolation between diploid and tetraploid *Chamerion angustifolium*. *Journal of Ecology* 88: 689–701.

Jersáková J, Castro S, Sonk N, Milchreit K, Schodelbauerova I, Tolassch T, Steafan D (2010) Absence of pollinator-mediated premating barriers in mixed-ploidy populations of *Gymnadenia conopseas*.l. (Orchidaceae). *Evolution Ecology* 24:1199–1218.

Kennedy BF, Sabara HA, Haydon D, Husband BC (2006) Pollinator-mediated assortative mating in mixed ploidy populations of *Chamerion angustifolium* (Onagraceae). *Oecologia* 150:398–408.

- 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.
- Levin DA (1975) Minority Cytotype Exclusion in Local Plant Populations. *Taxon* 24: 35-43.
- Loureiro J, Rodriguez E, Dolerezel J, Santos C (2007) Two New Nuclear Isolation Buffers for Plant DNA Flow Cytometry: A Test with 37 Species. *Annals of Botany* 100: 875–888.
- Machado CSI, Barros ML (1997) Phenology of Caatinga Species at Serra Talhada, PE, Northeastern Brazil. *Biotropica* 29 (1): 5748.
- Masterson J (1994) Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in Majority of Angiosperms. *Science* 264: 421-424.
- Newstrom LE, Frankie GW, Baker HG (1994) A new classification for plant phenology based on flowering patterns in lowland tropical rain forest trees at La Selva, Costa Rica. *Biotropica* 26:141–15.
- Petit C, Bretagnolle F, Felber F (1999) Evolutionary consequences of diploid-polyploid hybrid zones in wild species. *Trends in Ecology and Evolution* 14: 306–311.
- Petit C, Lesbros P, Ge X, Thompson D (1997) Variation in flowering phenology and selfing rate across a contact zone between diploid and tetraploid *Arrhenatherum elatius* (Poaceae). *Heredity* 79: 31—40.
- Queiroz L P (2009) Leguminosas da Caatinga. Editora da Universidade Estadual de Feira de Santana.
- Ramsey J, Schemske DW (1998) Pathways, mechanisms, and rates of polyploidy formation in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29: 467-501.
- Rausch JH, Morgan MT (2005) The effect of self-fertilization, inbreeding depression, and population size on autopolyploid establishment. *Evolution* 59, 1867-1875.

- Rodriguez DJ (1996) A model for the establishment of polyploidy in plants. *American Naturalist* 147: 33–46.
- Robinson I (1924) Die farbungsreaktion der narbe, stigmatochromie, als morpho-biologische Blütenuntersuchungsmethode. *Sitzungsberichten Akademischer Wissenschaft Wien, Mathematics, Abteilung* 133:180-213
- Segraves KA, Thompson JN (1999) Plant polyploidy and pollination. Floral traits and insect visits to diploid and tetraploid *Heuchera grossulariifolia*. *Evolution* 53: 1114–1127.
- Soltis DE, Soltis PS, Schenck DW, Hancock JF, Thompson JN, Husband BC, Judd WS (2007) Autopolyploidy in angiosperms: have we grossly underestimated the number of species? *Taxon* 56 (1).
- Stebbins GL (1971) *Chromosomal Evolution in Higher Plants*, Edward Arnold, London, 216.
- Tate, A.T.; Simpson, B.B. 2004. Breeding system evolution in *Tarasa* (Malvaceae) and selection for reduced pollen grain size in the polyploidy species. *American Journal of Botany* 91(2): 207-213.
- Zar J H (1999) *Biostatistical analysis*. New Jersey: Prentice Hall Inc., 662p.

Tabela 1. Morfometria floral (média \pm desvio padrão) de citótipos diploides e tetraploides de *Libidibia ferrea* (Leguminosae - Caesalpinioideae) localizados em população mista no município de Poção, Pernambuco.

Parâmetro (mm)	Diploides média \pm DP	Tetraploides média \pm DP	t e p
<i>Corola</i>			
Comprimento horizontal	10.914 \pm 1.578	14.866 \pm 0.751	t= 9.152; p<0.0001
Comprimento vertical	9.051 \pm 0.982	10.667 \pm 0.847	t= 6.821; p<0.0001
<i>Ovário</i>			
Comprimento	3.242 \pm 0.424	4.300 \pm 0.356	t= 10.45; p<0.0001
Diâmetro	0.935 \pm 0.122	1.082 \pm 0.132	t= 4.613; p<0.0001
<i>Estilete</i>			
Comprimento	5.960 \pm 1.122	7.159 \pm 0.581	t= 5.194; p=0.0001
Diâmetro	0.359 \pm 0.053	0.443 \pm 0.060	t= 5.692; p<0.0001
<i>Estames</i>			
Comprimento	8.704 \pm 0.647	9.708 \pm 0.510	t= 6.671; p<0.0001
<i>Plataforma de pouso</i>			
Comprimento	7.945 \pm 0.632	9.084 \pm 0.714	t= 6.534; p<0.0001
<i>Nectário</i>			
Volume	0.529 \pm 0.249	0.975 \pm 0.438	t= 4.843; p<0.0001

Tabela 2: Número de flores por inflorescência, número de flores abertas/dia e razão P/O (pólen/óvulo) (média \pm desvio padrão) de indivíduos diploides e tetraploides de *Libidibia ferrea* (Leguminosae - Caesalpinioideae) em população mista no município de Poção, Pernambuco.

Parâmetros analisados	Diploides média \pm DP	Tetraploide média \pm DP	t e p
Número de flores por inflorescência	169.1 \pm 82.66	377.1 \pm 125.4	t= -6.191; p<0.0001
Número de flores abertas/dia	9.489 \pm 5.299	9.424 \pm 5.592	t= - 0.052; p= 0.958
Número de grãos de pólen/flor	652.4 \pm 138.1	768.9 \pm 298.6	t= - 0.926; p= 0.183
Número de óvulos/flor	9.0 \pm 1.414	10 \pm 0	t= - 2.231; p= 0.052
Razão P/O	869.4 \pm 138.1	914 \pm 168.6	t= - 0. 213; p= 0.833
Tamanho dos grãos de pólen	7.656 \pm 0.681	9.568 \pm 0.753	p <0.001

Tabela 3. Visitantes florais, com respectivos recursos florais coletados e comportamentos de visitas, de indivíduos diplóides (D) e tetraplóides (T) de *Libidibia ferrea* (Leguminosae - Caesalpinioideae) localizados em população mista no município de Poção, Pernambuco.

Espécie	Citótipo visitado	Recurso coletado	Comportamento
<i>Abelhas</i>			
Hymenoptera – Apidae			
<i>Apis mellifera</i> Linnaeus, 1758	D/T	Néctar/pólen	Polinizador ocasional
<i>Centris</i> sp.1	D/T	Néctar	Polinizador efetivo
<i>Centris</i> sp.2	D/T	Néctar	Polinizador efetivo
<i>Trigona spinipes</i> (Fabricius, 1793)	D/T	Néctar/pólen	Polinizador ocasional
<i>Xylocopa frontalis</i> (Olivier, 1789)	D/T	Néctar	Polinizador efetivo
<i>Xylocopa grisescens</i> Lepeletier, 1841	T	Néctar	Polinizador efetivo
<i>Xylocopa</i> sp.	T	Néctar	Polinizador efetivo
<i>Beija-flores</i>			
Apodiformes – Trochilidae			
<i>Chlorostilbon aureoventris</i> (Shaw, 1812)	D/T	néctar	Pilhador
<i>Borboletas</i>			
Lepidoptera			
Indet. 1	D/T	-	Pilhador
Indet. 2	D/T	-	Pilhador
Indet. 3	D/T	-	Pilhador

LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 1. (A-D) Porcentagem de indivíduos diploides e tetraploides de *Libidibia ferrea* (Leguminosae - Caesalpinioideae) localizados em população mista no município de Poção, Pernambuco, com suas respectivas fenofases ao longo dos meses de observação: **A)** Fenofase botão; **B)** Fenofase flor; **C)** Fenofase frutos verdes. **D)** Fenofase frutos maduros. Indivíduos diploides são representados pelas linhas tracejadas, e indivíduos tetraploides pelas linhas contínuas.

Figura 2. (A-D) Índice de intensidade de Fournier em indivíduos diploides e tetraploides de *Libidibia ferrea* (Leguminosae - Caesalpinioideae) localizados em população mista no município de Poção, Pernambuco, com suas respectivas fenofases ao longo dos meses de observação: **A)** Fenofase botão; **B)** Fenofase flor; **C)** Fenofase frutos verdes. **D)** Fenofase frutos maduros. Indivíduos diploides são representados pelas linhas tracejadas, e indivíduos tetraploides pelas linhas contínuas.

Figura 3. (A-B) Número total de inflorescências visitadas ao longo da antese floral nos citótipos tetraploides (**A**) e diploides (**B**) de *Libidibia ferrea* (Leguminosae - Caesalpinioideae) localizados em população mista no município de Poção, Pernambuco.

Figura 4. Número total de flores visitadas pelos polinizadores efetivos dos gêneros *Centris* e *Xylocopa* (abelhas) nos citótipos diploides e tetraploides de *Libidibia ferrea* (Leguminosae - Caesalpinioideae) localizados em população mista no município de Poção, Pernambuco.

Figura 5. Número total de grãos de pólen depositados em estigmas de citótipos diploides e tetraploides de *Libidibia ferrea* (Leguminosae - Caesalpinioideae) localizados em população mista no município de Poção, Pernambuco.

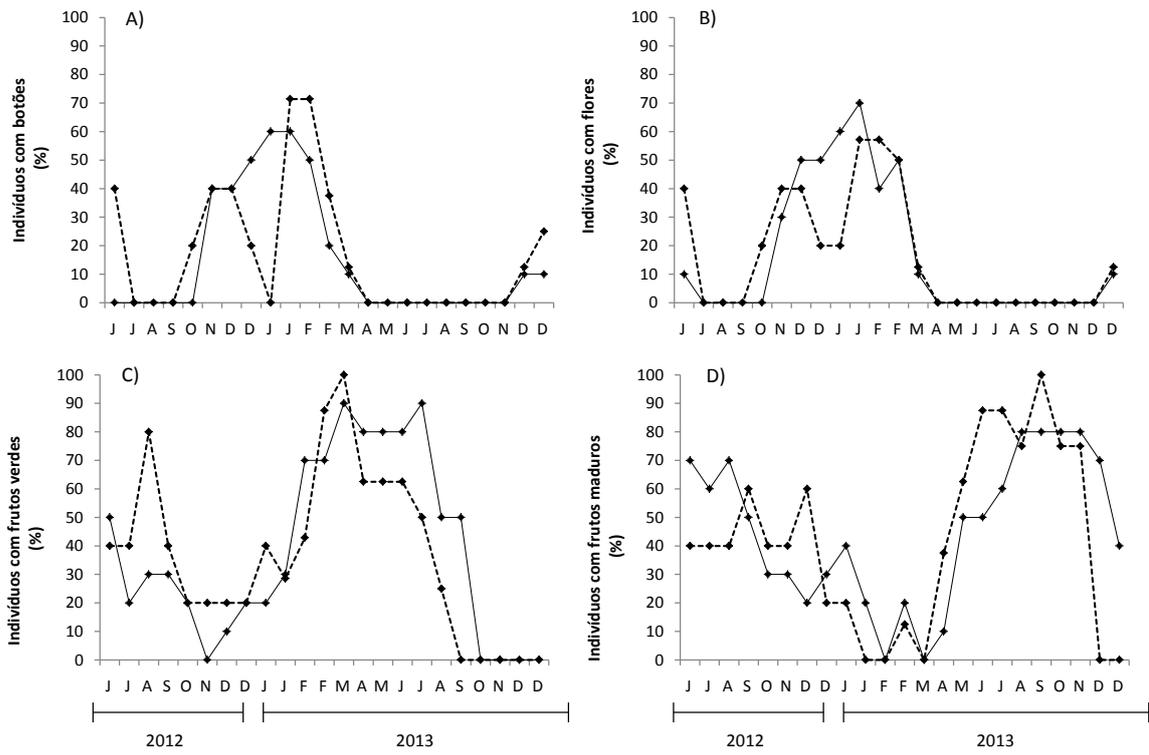


Fig.1

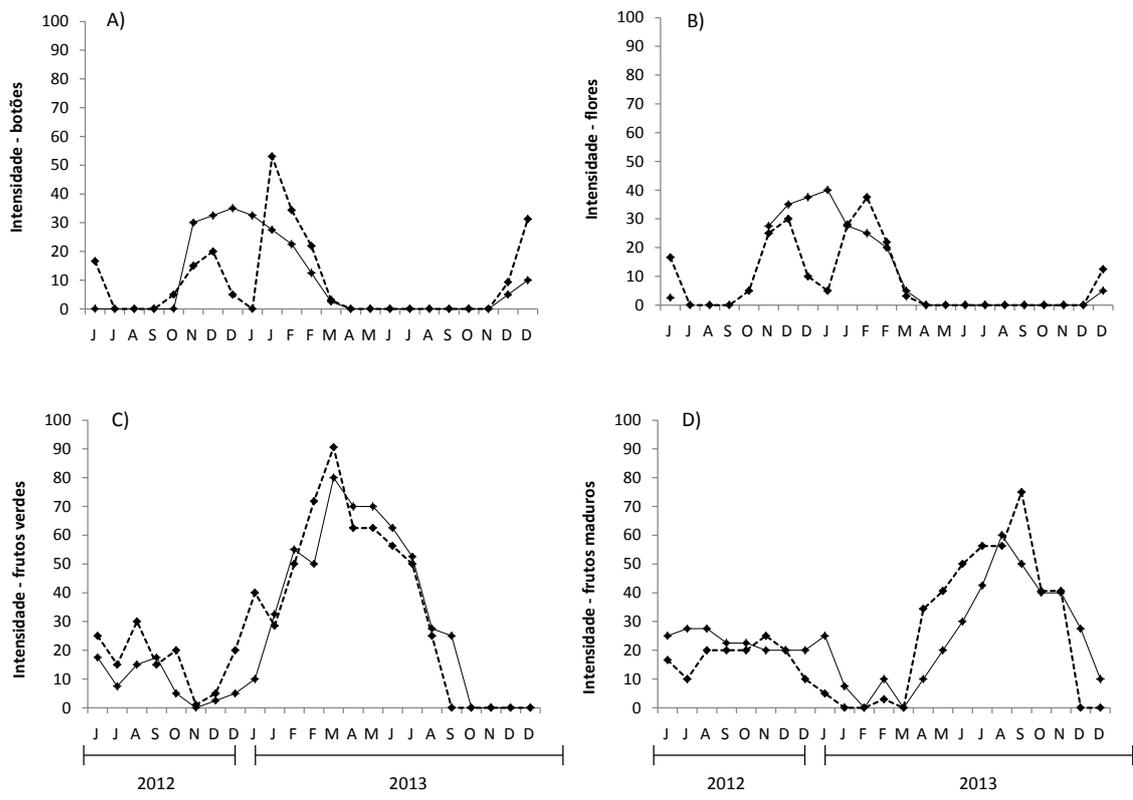


Fig.2

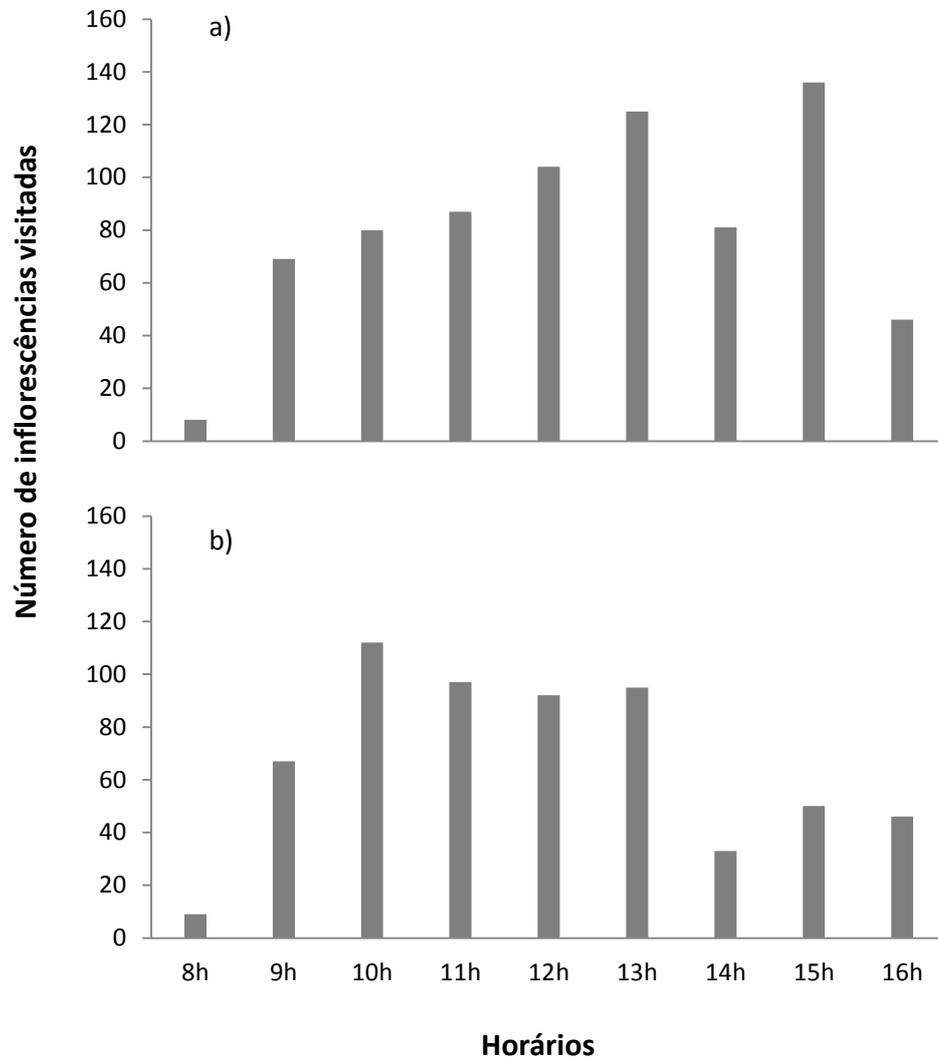


Fig. 3

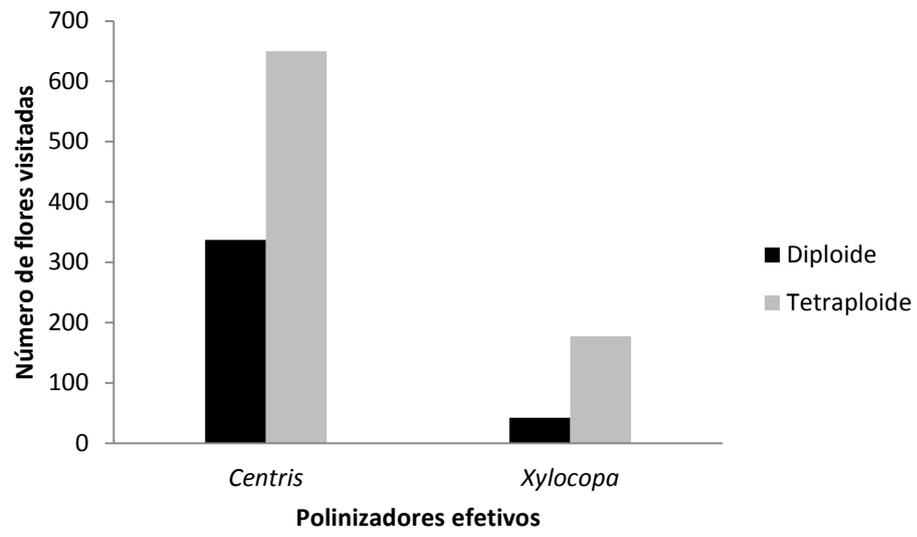


Fig.4

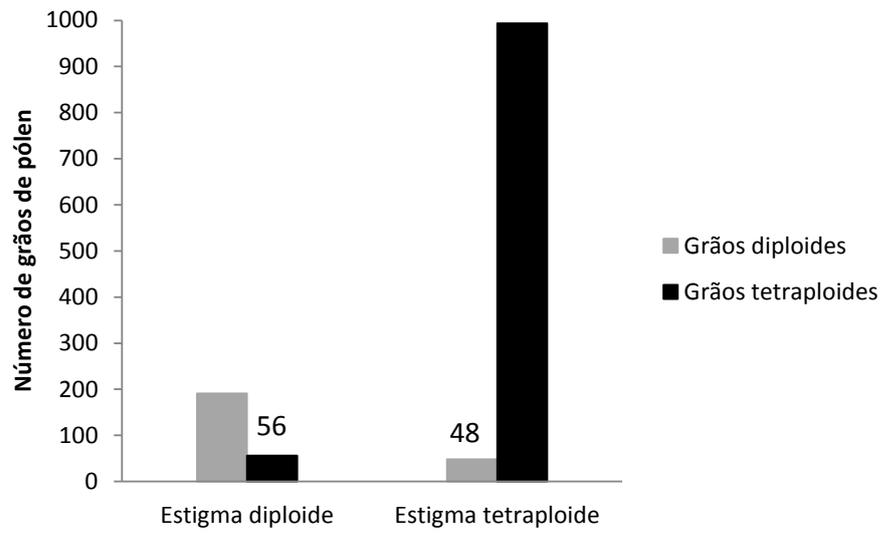


Fig. 5

REFERENCIAS

- BORGES, L.A.; SOUZA, L.G.R.; GUERRA, M.; MACHADO, I.C.; LEWIS, G.P.; LOPES, A.V. 2012. Reproductive isolation between diploid and tetraploid cytotypes of *Libidibia ferrea* (= *Caesalpinia ferrea*) (Leguminosae): ecological and taxonomic implications. **Plant Systematics and Evolution**, Published online: 05 May 2012 Published online: 05 May 2012 (DOI: 10.1007/s00606-012-0643-3).
- BELTRÃO, G.T.A.; GUERRA, M. 1990. Citogenética de angiospermas coletadas em Pernambuco – III. **Ciência e Cultura** **42**: 839-845.
- 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.
- GRANT, V. 1981. **Plant Speciation**. Columbia University Press. New York .
- GRANT, V. 1992. Floral isolation between ornithophilous and sphingophilous species of *Ipomopsis* and *Aquilegia*. **P Natl Acad Sci USA** **89**:11828–11831.
- HUSBAND, B. C.; SABARA, H. A. 2004. Reproductive isolation between autotetraploids and their diploid progenitors in fireweed, *Chamerion angustifolium* (Onagraceae). **New Phytologist** **161**: 703–713.
- HUSBAND, B.C.; SCHEMSKE, D.W. 2000. Ecological mechanisms of reproductive isolation between diploid and tetraploid *Chamerion angustifolium*. **Journal of Ecology** **88**: 689–701.
- JERSÁKOVÁ, J.; CASTRO, S.; SONK, N.; MILCHREIT, K.; SCHODELBAUEROVA, I.; TOLASSCH, T.; STEAFAN, D. 2010. Absence of pollinator-mediated pre-mating barriers in mixed-ploidy populations of *Gymnadenia conopsea* L. (Orchidaceae). **Evolutionary Ecology** **24**:1199–1218.
- JIAO, Y. et al. 2011. Ancestral polyploidy in seed plants and angiosperms. **Nature** **473**: 97-100.
- KENNEDY, B.F.; SABARA, H.A.; HAYDON, D.; HUSBAND, B.C. 2006. Pollinator-mediated assortative mating in mixed ploidy populations of *Chamerion angustifolium* (Onagraceae). **Oecologia** **150**:398–408.
- 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.; SCHIRE, B., MACKINDER, B.; LOCK, M. 2005. **Legumes of the world**. Royal Botanic Gardens, Kew
- MASTERSON, J. 1994. Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in Majority of Angiosperms. **Science 264**: 421-424.
- OTTO, S. P., AND J. WHITTON. 2000. Polyploid incidence and evolution. **Annual Review of Genetics 34**: 401-437.
- PETIT, C.; LESBROS, P.; GE, X.; THOMPSON, J.D. 1997. Variation in flowering phenology and selfing rate across a contact zone between diploid and tetraploid *Arrhenatherum elatius* (Poaceae). **Heredity 79**: 31-40.
- PETIT, C.; BRETAGNOLLE, F.; FELBER, F. 1999. Evolutionary consequences of diploid-polyploid hybrid zones in wild species. **Trends in Ecology and Evolution 14**: 306–311.
- QUEIROZ, L. P. **Leguminosas da Caatinga**. 2009. Editora da Universidade Estadual de 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.
- REISEMBERG, L.H.; WILLIS, J.H. 2007. Plant Speciation. **Science 317**: 910-15.
- RODRIGUEZ, DJ. 1996. A model for the establishment of polyploidy in plants. **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 *Heucheragrossulariifolia*. **Evolution 53**: 1114–1127.
- SOLTIS,D.E.; SOLTIS, P.S.; SCHEMSKE, D.W.; HANCOCK, J.F.; THOMPSON, J.N.; HUSBAND, B.C.; JUDDL, W.S. 2007. Autopolyploidy in angiosperms: have we grossly underestimated the number of species? **Taxon 56** (1).
- SOLTIS, D.E; SOLTIS, P.S. 2012. **Polyploidy and Genome Evolution**. Springer, Berlin Heidelberg.
- STEBBINS, G.L. 1971. **Chromosomal Evolution in HigherPlants**. Addison-Wesley, London.
- TAYALÉ, A.; PARISOD, A. 2013. Natural Pathways to polyploidy in plants and consequences for genome reorganization. **Cytogenetic and Genome Research 143**: 79-96.

- THOMPSON, J.N.; NUISMER, S.L.; MERG, K. 2004. Plant polyploidy and the evolutionary ecology of plant/animal interactions. **Biological Journal of the Linnean Society**. **82**: 511–519.
- VAN DIJK, P.; BAKX-SCHOTMAN, T. 1997. Chloroplast DNA phylogeography and cytotype geography in autopolyploid *Plantago media*. **Molecular Ecology** 6: 345-352.