

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE BIOCÊNCIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL**

**LUCIANA SOARES LIMA**

---

**FUNCIONALIDADE DA HETEROSTILIA E EFICIÊNCIA REPRODUTIVA DE  
*OXALIS PSORALEOIDES* MART. EX ZUCC. (OXALIDACEAE): UMA ESPÉCIE  
TRISTÍLICA DA REGIÃO SEMI-ÁRIDA DO BRASIL**

---

**RECIFE**

**2018**

**LUCIANA SOARES LIMA**

**FUNCIONALIDADE DA HETEROSTILIA E EFICIÊNCIA REPRODUTIVA DE  
*OXALIS PSORALEOIDES* MART. EX ZUCC. (OXALIDACEAE): UMA ESPÉCIE  
TRISTÍLICA DA REGIÃO SEMI-ÁRIDA DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal. Área de concentração: correspondente ao indicado na ata da defesa.

Orientadora: **DR<sup>a</sup>. ISABEL CRISTINA MACHADO**

**RECIFE**

**2018**

Catálogo na Fonte:  
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB4/1788

Lima, Luciana Soares

Funcionalidade da heterostilia e eficiência reprodutiva de *Oxalis psoraleoides* Mart.  
Ex. Zucc. (Oxalidaceae) : uma espécie tristílica da região semi-árida do Brasil /  
Luciana SoaresLima. – 2018.

83 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Isabel Cristina Machado.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.  
Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia  
Vegetal, Recife, 2018.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Plantas da Caatinga. 2. Botânica. 3. Plantas - Reprodução. I.  
Machado, Isabel Cristina (orientadora). II. Título.

634.909811

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2022-193

**LUCIANA SOARES LIMA**

**FUNCIONALIDADE DA HETEROSTILIA E EFICIÊNCIA REPRODUTIVA DE  
*OXALIS PSORALEOIDES* MART. EX ZUCC. (OXALIDACEAE): UMA ESPÉCIE  
TRISTÍLICA DA REGIÃO SEMI-ÁRIDA DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal. Área de concentração: Ecologia e conservação.

APROVADA EM: 30/08/2018

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Prof. Dra. Isabel Cristina Machado (Orientador) – UFPE

---

Dr. Túlio Freitas Filgueira de Sá – (Membro externo)-UFRPE

---

Dra. Ana Carolina Galindo da Costa – (Membro externo)- Pós-Doc UFPE

**RECIFE**

**2018**

*Aos meus pais,  
Marlene Lopes Soares e Samuel Alves Lima,  
pelo incentivo nos estudos  
e ensinamentos que levarei por toda a vida.  
Graças a eles pude chegar até aqui.*

## AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos aqui proferidos vêm no sentido de buscar expressar em poucas palavras minha gratidão àqueles, que de uma forma ou de outra, puderam me ensinar e ajudar, seja na composição deste trabalho, seja durante os dois anos e meio de mestrado, através de apoio direto ou indireto e convivência saudável em laboratório.

À Deus, por seu grande amor e zelo por mim, dando sempre forças para que eu pudesse suportar os momentos mais difíceis.

Aos meus pais, Marlene Lopes Soares e Samuel Alves Lima que sempre me apoiaram e me incentivaram a lutar pelos meus sonhos.

À minha querida orientadora, Isabel Machado, por seus sinceros conselhos, pela sua ajuda na construção dos textos, sugestões de correções e por sua extrema paciência comigo, pelo seu apoio e cuidado, por ser uma inspiração e mãe para mim.

Aos membros convidados para compor a banca de mestrado: Ana Carolina Costa, Túlio de Sá, Ariadna Lopes e Tarcila Nadia, por aceitarem participar da minha banca examinadora, enriquecendo o trabalho com suas contribuições e avaliações.

À equipe do Laboratório de Biologia Floral e Reprodutiva (Polinizar) pelo apoio e convivência saudável que permitiram e me incentivaram a chegar até aqui. Principalmente aos amigos Arthur Melo, Sinzinando Albuquerque, Carol Costa e Nayara Albuquerque por me ajudarem nos momentos difíceis e me darem todo apoio, e serem extremamente prestativos e cuidadosos comigo.

Aos amigos de graduação da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) André Vale, Liana Trovão, Elias, Marta Belfort, Lucas Martins, Rafael Antônio Brandão, Leila, Fernanda, Marco Antônio por compartilharem alegrias e superações durante o mestrado.

Aos colegas de turma de mestrado Jackeline, Nathália, Luanda, Milena e Arthur Gonçalves por compartilhar seus momentos comigo e serem extremamente companheiros e prestativos. Por me proporcionarem apoio e dicas em muitos momentos.

Ao Programa de Apoio e Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado, indispensável para execução do projeto e custeio da minha estadia em Recife. E ao PELD, por fornecer apoio de estadia durante as viagens de campo ao Catimbau.

Aos amigos Ana Carolina, Arthur e Sinzinando pela ajuda na construção e correção do manuscrito da dissertação, por cederem seu tempo precioso para dar sugestões, explicações e

por me estimular e ajudar sempre. Agradeço a vocês pelos conselhos e orientação durante todos os meus anos de mestranda, o que guardarei para sempre em meu coração.

Aos meus amores felinos Léia e Lino que sempre me deram muito carinho, amor e que me acalmavam, nos momentos mais estressantes.

## RESUMO

A heterostilia está associada ao polimorfismo das estruturas reprodutivas, podendo haver distilia ou tristilia, esta última menos frequente e com três tipos florais: brevistilo, longistilo e medistilo. É comum que espécies heterostílicas, incluindo tristilia, apresentem um sistema de incompatibilidade heteromórfica, alturas recíprocas nos órgãos sexuais entre os morfos florais e uma razão equilibrada na proporção desses morfos. Este trabalho buscou detectar a variação dos morfos florais em uma população tristílica de *Oxalis psoraleoides* (Oxalidaceae) na Caatinga e analisar os possíveis mecanismos envolvidos. Investigamos a variação da razão dos morfos, a reciprocidade estigma-antera através do índice de inacurácia floral, a frequência de visitantes/polinizadores e avaliamos o sistema reprodutivo da espécie. O tipo floral medistilo ocorre em maior frequência (M-morph = 48,97%), seguido do longistilo (L-morph = 29,59%) e do brevistilo (S-morph = 21,42%). Os valores de hercogamia recíproca representados pela análise da inacurácia variou entre 0,64 e 0,99 mm<sup>2</sup> no órgão baixo (antera L-morph e estigma S-morph) e no órgão alto (antera M-morph com estigma L-morph) respectivamente, sendo 0 o maior grau de reciprocidade entre os órgãos sexuais. A frequência de visitas de lepidópteros (56,58%) foi maior que a de abelhas (43,42%). Em relação ao sistema reprodutivo, só houve formação de frutos no tratamento de polinização cruzada e no controle. No controle, o morfo medistilo formou mais frutos. Embora forme frutos na polinização cruzada ilegítima, *O. psoraleoides* não foi considerada autocompatível. Concluímos que a tristilia mantém um elevado grau de hercogamia recíproca quando comparado com outras espécies heterostílicas e um sistema autointramorfo incompatível. Acreditamos que as alterações no sistema de incompatibilidade heteromórfico, observadas pela presença de cruzamentos ilegítimos, não foi um fator determinante para a ocorrência de anisopletia na população e consideramos *O. psoraleoides* uma espécie tristílica atípica, pela desproporção entre os morfos e desvios nos graus de compatibilidade, com formação de frutos entre estruturas de níveis diferentes. Por fim, sugerimos que o sistema de polinização generalista possa estar interferindo no desbalanceamento dos três morfos, sustentado pelo fato de só haver formação de frutos nos cruzamentos legítimos e ilegítimos intermorfos.

**Palavras-chave:** Caatinga; Sistema Incompatibilidade Heteromórfico; hercogamia recíproca; heterostilia; polinização mista; anisopletia.

## ABSTRACT

Heterostyly is associated with polymorphism of the reproductive structures, and there can be distyly or tristyly, the latter less frequent and with three floral types: short-, mid- and long-styled. It is common for heterostylous species, including tristyly, to have a heteromorphic incompatibility system, reciprocal heights in the sexual organs between floral morphs, and a balanced ratio in the proportion of these morphs. This work aimed to detect the variation of floral morphs in a tristylous population of *Oxalis psoraleoides* (Oxalidaceae) in Caatinga and analyze the possible mechanisms involved. We investigated the variation of the morph ratio, the stigma-anther reciprocity through the floral inaccuracy index, the frequency of visitors/pollinators and evaluated the reproductive system of the species. The mid-styled floral type occurs most frequently (M-morph = 48.97%), followed by long-styled (L-morph = 29.59%) and short-styled (S-morph = 21.42%). The reciprocal herkogamy values represented by the inaccuracy analysis ranged between 0.64 and 0.99 mm<sup>2</sup>, in the low organ (L-morph anther and S-morph stigma) and the high organ (M-morph anther with L-morph stigma) respectively, with 0 being the highest degree of reciprocity between sexual whorl levels. The frequency of Lepidoptera visits (56.58%) was higher than that of bees (43.42%). Regarding the reproductive system, fruit formation only occurred in the cross-pollinated treatment and in the control. In the control, the mid-styled produced more fruits. Although it forms fruit in illegitimate cross-pollination, *O. psoraleoides* was not found to be self-compatible. We conclude that tristyly maintain a high degree of reciprocal herkogamy when compared to other heterostylous species and an incompatible self-intramorphic system. We believe that the alterations in the heteromorphic incompatibility system, observed by the presence of illegitimate crosses, was not a determining factor for the occurrence of anisoplety in the population and we consider *O. psoraleoides* an atypical tristyly species, by the disproportion between morphs and deviations in the degrees of compatibility, with fruit formation between structures of different levels. Finally, we suggest that the generalist pollination system may be interfering with the imbalance of the three morphs, supported by the fact that there is only fruit formation in legitimate and illegitimate intermorph crosses.

**Keywords:** Caatinga; Heteromorphic Incompatibility System; reciprocal herkogamy; heterostyly; mixed pollination; anisoplety.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figure 1-** Representation of the analysis of the inaccuracy of low, medium and high organs of the reproductive structures of *Oxalis psoraleoides* Kunth. (Oxalidaceae) in the Catimbau National Park, Buíque, Pernambuco.....60
- Figure 2** – Pollination experiments performed on *Oxalis psoraleoides* Kunth.: I-Cross-pollination, in which the morphs receive pollen from another individual; the continuous blue arrows represent legitimate crossings (crossings between reproductive structures of different morphs and of the same height) and the dashed red arrows represent illegitimate crossings (crossings between the same morphs or between different morphs with reproductive structures of different heights); II-Spontaneous self-pollination, plants are bagged with a vole fabric to observe the development or not of fruits without contact with pollinators; III-Manual pollination, anthers of the flower itself are manually transferred to their stigmas, in the same flower and IV-Agamospermy, the stamens are removed from the flower (emasculation) to observe possible fruit formation.. .....61
- Figure 3** – Sequence of anthesis of *Oxalis psoraleoides* in PARNA Catimbau, Pernambuco - Brazil. (A) Times of anthesis events and (B) proportion of receptive stigmas throughout anthesis in the different morphs. (Horizontal solid lines - anthesis events; dashed curve - Long-styled; dashed/dotted curve - Mid-styled; dotted curve - short-styled.....62
- Figure 4** – Floral visitors of *Oxalis psoraleoides* Kunth. in Catimbau National Park, Buíque, Pernambuco, Brazil: (A) Bombyliidae (Diptera) plundering nectar, through its long mouth apparatus in a flower of *O. psoraleoides*, where they stayed a long time in the flowers, however, the visits were infrequent; (B) *Ceratina* sp. collecting pollen from a long-styled morph of *O. psoraleoides* and contacting the reproductive structures, being considered pollinators (Apidae: Tribe *Xylocopini*); (C) and (D) *Hesperiidae* (Lepidoptera) landing on the corolla lobes and contacting the reproductive structures when collecting nectar, through their long proboscis, being considered pollinators. Scale 5 mm in the figures A, B, C and D.....63
- Figure 5** – Frequency of floral visitors during anthesis of *Oxalis psoraleoides* Kunth. in Catimbau National Park, Buíque, Pernambuco - Brazil. (A) Visits by *Apis mellifera* and native bees (B) Visits by butterflies and moths and (C) Separation of visitation peaks between Hymenoptera and Lepidoptera. (dashed gray line - *Apis mellifera*; dotted gray line - native bees; dashed black line - moths; dotted black line - butterflies; solid gray line - Hymenoptera; solid black line - Lepidoptera).....64
- Figure 6** – Floral morphs of the tristylous *Oxalis psoraleoides* Kunth.: Short-styled, Mid-styled and Long-styled (from left to right), with two levels of anthers in the flower and stigmas in three heights

(high, medium and low), resulting in the arrangement of high, medium and low organs in each of the morphs. Reproductive parts of morphs with tristily: Pistil (female reproductive structure) composed of stigma, style; Stamens (male reproductive structure): anther, connective and filament.....65

**Figure 7** – Morphometric measurements made in *Oxalis psoraleoides* Kunth. flowers (here exemplified in the long-styled morph): I- Floral tube length; II- Floral apex width; III- Pistil length; IV- Stigma width; V- Stigma length; VI-Style length; VII- Filament length (medium anther); VIII- Filament length (short anther); IX-Anther size; X- Stamen length (medium anther) and XI- Stamen length (short anther).....66

**Figure 8** – A: Fruit set by cross-pollination of *Oxalis psoraleoides* Kunth. (Oxalidaceae) in Catimbau National Park, Buíque, Pernambuco. S: short-styled, M: Mid-styled and L: Long-styled; Pollen donor: SA=Short anther, LA=Long anther, MA=Medium anther. B: Fruit set by control treatment of *Oxalis psoraleoides* Kunth. (Oxalidaceae) in Catimbau National Park, Buíque, Pernambuco. S: Short-styled, M: Mid-styled and L: Long-styled.....67

## LISTA DE TABELAS

- Table 1** – Frequency of floral visitors of *Oxalis psoraleoides* Kunth. in Catimbau National Park, Pernambuco, identified by species or family.....**53**
- Table 2** – Total frequency of *Oxalis psoraleoides* Kunth. floral visitors, by visiting hours in Catimbau National Park, Buíque, Pernambuco (Time 1: 6:00-8:00 a.m; time 2: 8:00-10:00 a.m; Time 3: 10:00-12:00 a.m; time 4: 12:00-15:00 a.m).....**54**
- Table 3** – Mean and standard deviation of measurements (in mm) of stamens and pistils, for each floral morph of *Oxalis psoraleoides*.....**56**
- Table 4** – Estimates of inaccuracy in *Oxalis psoraleoides* Kunth. (Oxalidaceae). The total inaccuracy is given by the sum of the inaccuracy values of the high, medium and low organ.....**57**
- Table 5** – Fruit set (%) after manual and natural pollination (Control) in *Oxalis psoraleoides*, only the control and intermorph cross-pollination treatments formed fruit, with no fruit formation in the intramorph, spontaneous self-pollination and manual self-pollination treatments. In intermorph cross-pollination, fruit formation occurred in both legitimate and illegitimate crosses. In the legitimate intermorph crossbreeding the production was higher in the mid-styled morph, followed by the long-styled and short-styled. Pollen donor: SA=Short anther, LA=Long anther, MA=Medium anther.....**58**
- Table 6** – Analysis of linear models (GLMs) to compare fruit set between treatments and fruit set between morphs and stamen levels in inter treatment. Values in bold indicate statistically significant differences. Fruit set differed between morphs and there was no interaction effect between the different treatments on fruit production. When analyzing fruit production in cross-pollination, there was only a difference in fruit production between morphs, regardless of the pollen donor anther level.....**59**

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>  | <b>13</b> |
| <b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>   | <b>15</b> |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>   | <b>23</b> |
| <b>3 ARTIGO: FUNCIONALIDADE DA HETEROSTILIA E EFICIÊNCIA REPRODUTIVA DE <i>OXALIS PSORALEOIDES</i> MART. EX ZUCC. (OXALIDACEAE): UMA ESPÉCIE TRISTÍLICA DA REGIÃO SEMI-ÁRIDA DO BRASIL.....</b> | <b>28</b> |
| <b>4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>  | <b>46</b> |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>  | <b>47</b> |
| <b>APÊNDICE A-TABELAS DO MANUSCRITO.....</b>  | <b>53</b> |
| <b>APÊNDICE B- FIGURAS DO MANUSCRITO.....</b>   | <b>60</b> |
| <b>ANEXO C-NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA FLORA.....</b>   | <b>68</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

O presente trabalho busca compreender a funcionalidade do polimorfismo floral (tristilia) e sua influência no sucesso reprodutivo de *Oxalis psoraleoides* (Oxalidaceae), para esclarecer variação da frequência dos morfos nas populações naturais desta espécie. A partir dos resultados encontrados foi possível compreender a ecologia da polinização e suas implicações na relação planta-polinizador. Entender a funcionalidade da tristilia, através dos estudos de biologia floral e reprodutiva, permitirá fazer previsões sobre a eficiência reprodutiva dos morfos florais tristílicos.

O sistema heterostílico mais complexo é o que envolve plantas com tristilia, sendo primordiais estudos que englobam esta temática devido à possibilidade de testar hipóteses sobre o sistema de auto-incompatibilidade heteromórfica, investigar a proporção dos morfos na população e verificar se existe uma provável relação entre a reciprocidade das estruturas reprodutivas e a produtividade para cada morfo da população.

Aqui estudamos uma espécie com tristilia, *Oxalis psoraleoides* L. (Oxalidaceae). Nela abordamos o sistema reprodutivo, com enfoque na eficiência reprodutiva para cada tipo floral, buscamos conhecer aspectos da biologia floral e reprodutiva, descrever a morfologia da flor e conhecer seus visitantes florais e polinizadores efetivos.

Antes de iniciar nossa abordagem, realizamos uma fundamentação teórica a fim de fornecer informação para o melhor entendimento deste trabalho e de gerar um arcabouço teórico sobre a tristilia, que envolve origem e evolução da heterostilia, ocorrência da tristilia em famílias botânicas, aspectos ecológicos e da biologia da população de espécies tristílicas, caracterização do sistema de auto-incompatibilidade heterostílico, dentre outros aspectos. E por fim, apresentamos a teoria da Alocação Sexual, que foi a base para formularmos as hipóteses e previsões sobre o sistema heterostílico de *Oxalis psoraleoides* L.

No capítulo desta dissertação, que corresponde a um manuscrito que será posteriormente enviado à Plant Biology, abordamos aspectos da biologia floral e reprodutiva da espécie e, buscamos responder as seguintes perguntas: i) Como é a morfologia de *Oxalis psoraleoides* e como ela difere entre os morfos brevistilo, mediostilo e longistilo? ii) Como estão distribuídas as frequências dos morfos? iii) Como é a sequência de antese dessa espécie de *Oxalis*? iv) Quem são os polinizadores e como é a frequência de visitas? v) Como a eficiência reprodutiva e os diferentes tratamentos reprodutivos diferem entre os tipos florais? Por fim, testamos a

hipótese de que o morfo longistilo terá maior receptividade estigmática, deposição de pólen no estigma e frequência na população devido a maior ênfase da função materna neste morfo. Em contrapartida, o morfo brevistilo terá maior quantidade de grãos de pólen, devido a ênfase da função paterna neste morfo. A partir disso, objetivamos: 1) Entender a funcionalidade da tristilia, 2) verificar se ocorrem diferenças quanto a produção de frutos entre os morfos e 3) as razões pelas quais ocorrem diferenciação do fitness entre os indivíduos. Fizemos isso através de testes estatísticos e medições das estruturas reprodutivas, observações da frequência de visitas e contagem da proporção dos morfos na população, observação da antese e verificação da receptividade estigmática. Também testamos sistema reprodutivo, efetividade da polinização e frutificação da espécie. Juntas, estas informações nos permitiram entender o papel da tristilia para a espécie e como funciona o sistema reprodutivo para cada tipo floral.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### *Especialização morfológica e funcional de plantas com heterostilia*

O estudo da polinização aborda as interações entre plantas e polinizadores, dentre as quais está o estudo da ecologia de populações com morfos heterostílicos (Endress 1994). A heterostilia por sua vez, está relacionada a variação morfológica do estilete e formação de diferentes morfos florais (brevistilo: estilete curto; longistilo: estilete longo ou mediostilo: estilete médio), resultando em plantas com sistemas distílicos, mais comum e que possuem dois morfos na população (brevistilo e longistilo) ou sistemas tristílicos (menos comum, e com três morfos na população: brevistilo, longistilo e mediostilo).

Tal linha de pesquisa se dedica também a investigar o sistema reprodutivo e variação dos morfos florais, auxiliando na compreensão do fitness floral e papel dos polinizadores para a diversificação dessas plantas. Esse contínuo interesse na reprodução de plantas heterostílicas resultou em descobertas como o sistema de auto-incompatibilidade heteromórfico e definição de um tipo de cruzamento mais eficaz entre os morfos, sendo reconhecido o cruzamento legítimo como o mais rentável e preciso. O sistema de auto-incompatibilidade (AI) está relacionado a formação de frutos e sementes viáveis apenas entre morfos diferentes e que tenham mesma altura das estruturas reprodutivas (convergência floral) e que ainda são impossibilitados de se autofecundar, devido a barreira espacial e fisiológica entre estames e estigmas.

Essa barreira espacial se refere ao posicionamento das estruturas reprodutivas (antras e estigmas) que estão diametricamente opostos um ao outro, resultando em uma estrutura que é inversamente simétrica, caracterizando um tipo de hercogamia recíproca (HR), por exemplo, se um estame é longo, seu estigma é curto e assim sucessivamente. A hercogamia recíproca, permite uma precisão floral, que é a base funcional dos cruzamentos legítimos, tendo como resultado uma equibilidade na composição populacional (igualdade na proporção dos morfos heterostílicos), manutenção da população, sucesso na reprodução sexuada e manutenção da relação planta-polinizador.

De modo geral, esses ajustes morfológicos nas flores, relacionados a especialização entre planta-polinizador, contribuíram para a precisão do fluxo de pólen legítimo, que é o pólen relacionado à formação de frutos e sementes viáveis (Barrett 2010). No entanto, nem sempre a reciprocidade das estruturas reprodutivas, denominada de Hercogamia recíproca (HR) afeta os níveis de proporção dos indivíduos e nem o fluxo de pólen (Sampson & Krebs 2012; Furtado 2015). Apesar disso, a elevada convergência entre as estruturas reprodutivas em sintonia com

o tipo de visitante específico, corrobora a eficiência reprodutiva via polinização cruzada, apenas se esta característica garantir maior fluxo de pólen legítimo (Consolaro 2008).

#### *Outros Tipos de variações morfológicas no estilete*

Ao longo do processo evolutivo, surgiram diversas modificações nas flores resultando em uma gama de variações no comprimento do estilete. São encontrados na literatura seis tipos de polimorfismos estilares, como por exemplo: heterostilia (que inclui a distilia e tristilia), bem como dimorfismos no comprimento e direcionamento do estilete, como enantiostilia, flexistilia e inversostilia (Turkettii *et al.* 2011).

A heterostilia, em especial pode ser destacada entre esses sistemas como um fenômeno morfológico caracterizado pela presença de flores com polimorfismos no comprimento do androceu e gineceu, denominada de hercogamia recíproca. Essa variação se dá de forma simultânea no comprimento do estilete e estames, que se subdivide na formação de dois morfos (distilia) ou três morfos (tristilia), resultando em um ajuste altamente especializado (Barrett 1993; Ferrero *et al.* 2016).

O dimorfismo no comprimento estilar por sua vez, é caracterizado pela ausência de variação no comprimento do estame, enquanto que o estilete tem comprimento variável em cada tipo floral. A enantiostilia apresenta uma flexibilidade do estilete, para direita ou para esquerda, ao longo de um eixo principal. Já a inversostilia é descrita como uma orientação alterna do estilete, para cima (longe das anteras) ou para baixo (em direção às anteras) (Barrett *et al.* 2000). Caso isso ocorra frente a diferentes momentos da antese, essa variação é chamada flexistilia (Pauw 2005).

#### *Histórico da heterostilia*

O início dos estudos sobre heterostilia teve uma grande contribuição com a publicação da obra de Darwin intitulada “The different forms of flowers on plants of the same species” em 1877 (apud Vuilleumier 1967). Darwin propôs que o mecanismo da heterostilia possuía um significado adaptativo que favorecia a polinização cruzada (Kohn & Barrett 1992), devido a eficiência em transferir pólen legítimo, proporcionar diversidade genética e níveis ótimos populacionais, como manutenção do tamanho da população e equibildade da proporção dos morfos. A variedade de diferentes posições das partes reprodutivas da flor (comprimento do estilete e altura dos estames) permitiria assim uma ampla gama de visitas e facilitaria a polinização intermorfos (polinização legítima), uma vez que os grãos de pólen de flores

brevistila, longistila e mesostila (ou medistila) tenderiam a se fixar em diferentes parte do corpo do polinizador, o que caracteriza a hercogamia recíproca (Krug *et al.* 2012).

Um dos primeiros trabalhos a abordar o estudo de plantas com heterostilia foi o de Vuilleumier (1967), o qual retoma as bases históricas e conceitos relacionados às plantas com diferentes comprimentos do estilete e estames. O termo heterostilia foi primeiramente utilizado por Hildebrand e posteriormente por Darwin, que cunhou os termos longistila e brevistila (Vuilleumier 1967). Esse autor observou ainda, que os cruzamentos eram “legítimos”, através da maior produção de sementes e frutos viáveis, apenas entre estruturas de mesmo nível, sendo assim uma flor brevistila (que possui estilete curto) teria maior receptividade se recebesse pólen doador das anteras curtas, dos morfos mediostilas e longistilas.

#### *Tipos de variação heterostílica*

Dentre os tipos de heterostilia o mais comum é a distilia em que há a presença de dois morfos (flores brevistilas e, longistilas) ocorrendo em diferentes famílias (Barrett 1992; Heuch 1979). A tristilia, no entanto, é menos frequente, ocorrendo em diferentes famílias de Angiospermas e apresenta três morfos (brevistila, longistila e mesostila) (Figura 2), que variam na população, sendo suas flores denominadas de tristílicas (Barrett & Richards 1990). Deste modo, a heterostilia é conhecida também por estar presente em apenas 28 famílias de plantas, e tem sido desde então importante linha de pesquisa em estudos sobre ecologia evolutiva, genética e biologia reprodutiva (Barrett & Shore 2008; Sánchez *et al.* 2010).

Em relação às famílias de plantas que são alvos de pesquisas sobre a variação dos morfos-florais em diferentes populações, temos a família Oxalidaceae que apresenta ampla distribuição no mundo, ocorrendo principalmente na África e Américas (Abreu *et al.* 2008). O gênero *Oxalis* é o maior da família e compreende cerca de 800 espécies (Lourteig 1983), das quais 114 ocorrem no Brasil, caracterizadas por apresentarem hábito herbáceo ou arbustivo, flores com estames de dois níveis e gineceu heterostílico, com a presença de três morfos-florais: brevistilo, longistilo e mesostilo (Costa *et al.* 2012).

*Oxalidaceae* é uma das famílias com registro de tristilia e o papel desse mecanismo na evolução e na manutenção de populações é ainda pouco compreendido (Ganders 1979; Ferrero 2014). Nessa família é observado tanto espécies tristílicas como distílicas, no entanto, há gêneros nesta família que são caracterizados pela homostilia, que consiste na presença de flores com estiletos de igual comprimento no mesmo indivíduo ou em indivíduos diferentes na mesma espécie (Vuilleumier 1967), sendo a família Oxalidaceae formada pelos gêneros *Oxalis*,

*Biophytum e Averrhoa* (Ornduff 1964). Em *Oxalis*, por exemplo, as flores são frequentemente tristílicas, porém a proporção dos três morfos-florais varia nas diferentes populações, sendo mais frequente os morfos longistilos e brevistilos (Luo *et al.* 2006).

#### *Origem e evolução da heterostilia*

Estudos sobre a origem e evolução da heterostilia englobam diversas hipóteses sobre a condição ancestral que resultaria na formação dos tipos distílicos e tristílicos (Baker 1966; Barrett & Shore 2008; Sánchez *et al.* 2010). A hipótese mais provável indica que a distilia seria resultado de uma condição tristílica ancestral que teria perdido um morfo, comumente o tipo mediostilo (Weller 1986; Weller 1992). Existem também duas hipóteses amplamente reconhecidas que tentam explicar a origem da heterostilia, sendo a primeira delas proposta por Charlesworth & Charlesworth (1979), em que aponta um modelo homostilo ancestral, que vai sofrendo mutações sucessivas na estrutura do pólen e estigma, resultando em um estado intermediário autoincompatível e incompatível com plantas do mesmo morfo. Outras mutações no estilete e estames desencadeiam a formação de um dimorfismo no comprimento das estruturas reprodutivas, originando assim os tipos distílicos (longistilo e brevistilo) na população. Neste modelo, a incompatibilidade heteromórfica é anterior à aquisição da hercogamia recíproca (Ferrero 2014; Costa *et al.* 2016).

Outro modelo proposto para explicar a origem e evolução da heterostilia é proposto por Lloyd & Webb (1992), em que o ancestral possuiria já hercogamia de aproximação (tipo de disposição espacial entre anteras e estigmas, onde um dos morfos possui o estigma acima das anteras), em seguida teriam ocorrido mutações simples no estilete resultando na formação de um dimorfismo estilar. No entanto, este estado estilar é instável devido à baixa reciprocidade entre os morfos. Deste modo, surgem outras mutações que modificam a altura das anteras também, pois isso aumentaria o nível de reciprocidade resultando em uma hercogamia recíproca e somente depois ocorre o surgimento de um sistema de incompatibilidade entre flores do mesmo morfo e autoincompatibilidade heterostílica (Ferrero 2014).

#### *Especialização morfológica e funcionalidade da Tristilia*

Outro tema recorrente são as pesquisas sobre a estrutura floral, que exploram o ciclo de vida da flor (fenologia da floração) e a funcionalidade das partes florais. Dessa forma, é relevante também a variação da produtividade nos indivíduos, por meio da quantificação da produção de frutos e sementes, resultado da eficiência no transporte de pólen pelos polinizadores, relacionados às pesquisas sobre ecologia da polinização. Diante desse crescente interesse sobre

a relação planta-polinizador, surgem trabalhos voltados para o estudo da tristilia, que podem auxiliar na compreensão da dinâmica populacional por meio da observação da frequência dos tipos florais e dinâmica de fluxo polínico entre os morfos (Shibaike *et al.* 1995; Sánchez *et al.* 2013).

Apesar do intenso debate sobre o sistema sexual de plantas heterostílicas, alguns fatores ainda não estão bem compreendidos, como, por exemplo, a razão pela qual existe variação e desaparecimento/redução de determinados morfos florais na população (Weber *et al.* 2012; Ferrer *et al.* 2016). A investigação da funcionalidade da tristilia e suas implicações para o sistema reprodutivo de populações ajudará na compreensão da dinâmica populacional, assim como os padrões de fluxo do pólen entre os morfos florais de plantas com este mecanismo (Faife-Cabrera *et al.* 2014).

Diante destas discussões foi observado que a existência de polimorfismos em flores, como por exemplo, o caso de heterostilia, pode resultar na tentativa de favorecer a dispersão de pólen, e otimizar a polinização cruzada, ou seja, evitar a autopolinização, gerando assim uma variedade de morfos florais com diferentes disposições das estruturas reprodutivas nas plantas (Stone & Thompson 1994). Com isso, a heterostilia poderia favorecer a função paterna, por promover mais eficientemente os cruzamentos intermorfos, resultando em menor perda de grãos de pólen (Barrett *et al.* 2000).

A variedade dos morfos em espécies tristílicas envolvem hercogamia recíproca (Marco & Arroyo 1998), uma vez que as estruturas reprodutivas estão posicionadas diametricamente opostas umas às outras, com isso a transferência de pólen mediada por polinizadores específicos é favorecida, evitando a autogamia (Barrett 1992). Tal mecanismo apresenta uma variedade de detalhes na morfologia floral, como por exemplo, o polimorfismo no tamanho das anteras e morfologia polínica (Ganders 1979), podendo ocorrer diferenças na quantidade, tamanho e forma dos grãos de pólen entre os morfos de flores com tristilia, sendo estes a variação mais comum entre plantas heterostílicas, do que na forma, coloração e escultura da exina (região mais externa que recobre os grãos de pólen) (Dulberger 1974).

Faegri & Pijl (1976) discutem a importância da heterostilia para a reprodução sexuada, ao impedir as chances de ocorrer autopolinização através da diferença de comprimento das estruturas reprodutivas, androceu e gineceu, resultando em maior variabilidade genética devido à recombinação entre os morfos. Os autores citam também que além da diversidade morfológica há outras características secundárias da heterostilia, como, por exemplo, diferenças no tamanho

e forma dos grãos de pólen, e na extensão do estigma podem ser observadas em plantas heterostílicas.

### *Sistema de incompatibilidade tristílico*

Dentre as atividades importantes envolvidas na ecologia da polinização de populações com heterostilia, percebe-se que pode haver variação nos picos de visitas dependendo das características do ambiente, tais como, altas altitudes, temperaturas baixas, declive e tipo de substrato que podem resultar em baixas atividades dos polinizadores, e por extensão na mudança do sistema de incompatibilidade (Arroyo *et al.* 2012). Essa mudança de incompatibilidade no sistema reprodutivo poderá favorecer a presença de processos autogâmicos nos morfos, e por consequência levará ao aumento da depressão endogâmica e baixo número de sementes viáveis (Nicholls 1986; Faife-Cabrera *et al.* 2014). Essa baixa atividade dos polinizadores nestas condições poderá afetar o equilíbrio na proporção de morfos florais, podendo desencadear baixa frequência e/ ou desaparecimento de algum dos tipos florais em populações com tristilia (Arroyo *et al.* 1985; Costa *et al.* 2016).

Estudos sobre tristilia, indicam que o morfo mediostilo é em geral, o menos abundante em sistemas heterostílicos, devido a sua morfologia e disposição espacial de anteras e estigmas facilitarem mecanismos de autopolinização e sucessivas taxas de endogamia. Essas taxas de autogamia, diminuem a permanência e frequência deste morfo na população, resultando no desvio à equabilidade dos morfos, situação não esperada para sistemas tristílicos (xxx). Para o sistema de Auto Incompatibilidade tristílico (SAI), esperamos que ocorra formação de sementes e frutos viáveis apenas entre estruturas de mesma altura ou nível (mesma convergência floral) e que não haja cruzamentos de auto polinização nem na mesma flor ou planta/indivíduo. No entanto, há sistemas tristílicos que podem apresentar quebra do SAI, sendo classificados então nas seguintes categorias:

*i) Quebra parcial do Sistema de Auto incompatibilidade heteromórfica: ocorre quando o número de sementes e/ou frutos formados é similar ou menor ao número de sementes e /ou frutos formados por cruzamentos legítimos;*

*ii) Quebra total do Sistema de Auto incompatibilidade heteromórfica: ocorre quando o número de semenres e/ ou frutos formados é maior que o número de sementes e /ou frutos formados por cruzamentos legítimos;*

*Teoria da Alocação sexual*

A compreensão dessa variação de morfos e de suas relações tróficas em comunidades com flores heterostílicas pode ser esclarecida com base na Teoria da Alocação do sexo, proposta com Casper & Charnov (1982). Esta teoria prediz que a diferença na alocação de recursos pode resultar em maior investimento na função materna ou paterna, caso observado em diversas populações com flores tristílicas (Brunet & Charlesworth 1995). No entanto, pode haver situações em que ocorre o equilíbrio ou compensação das duas funções sexuais, onde, por exemplo, um dos morfos apresenta maior quantidade de pólen, enquanto que no outro haverá grãos de pólen de maior tamanho (Dulberger 1974). Dessa forma, o mecanismo da tristilia, através das funções materna e paterna, poderá influenciar no fitness e valor adaptativo de cada tipo floral, tornando-se importante, portanto, conhecer as relações reprodutivas envolvidas nestes processos, para entender a variação dos morfos na população (Charlesworth 1979; Ornduff 1972; Gardner *et al.* 2012; Weber *et al.* 2012).

O estudo do sistema reprodutivo em plantas heterostílicas pode ser compreendido com base na Teoria da alocação sexual, originalmente proposto para plantas dióicas e posteriormente aplicado às plantas com heterostilia (Casper & Charnov, 1982). Essa teoria afirma que o “fitness” de uma planta, através da função materna e paterna pode variar entre os morfos na população, gerando uma desigual proporção (anisopletia) de flores longistilas, brevistilas e mediostilas. Essa diferença no sucesso reprodutivo entre os tipos florais pode ocorrer devido à oscilação na disponibilidade de recursos, competição, alterações na estrutura da população e diferentes estratégias reprodutivas, resultando na especialização da função materna ou paterna na flor (Goldman & Willson 1986). A maior ênfase da função materna pode ser percebida por meio da produção de sementes e/ou frutos, enquanto que a função paterna é mensurada pela produção de grãos de pólen (Brunet 1992).

#### *Polinização na Caatinga*

A Caatinga é um tipo vegetacional exclusivamente brasileiro (Aguiar *et al.* 2002), predominante sobre o Pernambuco, abrangendo cerca de 83% do estado (Hueck 1972). Segundo o estudo de Lavor & Ramos (2016), os sistemas de polinização na Caatinga apresentam a entomofilia como a síndrome floral mais frequente, ocorrendo em 76,12 % das espécies, seguida pela ornitofilia (17,91% das espécies) e quiropterofilia (5,97% das espécies). Dentro da entomofilia, a melitofilia é o tipo mais frequente (52,24), no entanto, é observada uma gama de abelhas generalistas, como *Apis mellifera* e *Trigona spinipes*, revelando que o Bioma Caatinga apresenta uma funcionalidade importante para a manutenção de espécies raras (Pigozzo & Viana 2010), por sustentar e fornecer recursos para outros grupos vegetais e animais mais

frágeis. Há diversos trabalhos abordando os sistemas de polinização na Caatinga, como, por exemplo, Machado & Lopes (2003,2004), Lopes (2002), Santos (2005), dentre outros. Já o sistema ornitófilo na Caatinga, mediado principalmente por beija-flores, ocorre amplamente nas famílias *Cactaceae* e *Bromeliaceae*, e suas flores apresentam algumas características como corola tubular, pétalas vermelhas e abundância de néctar (Endress 1994). É notado também que em ambientes de Caatinga, há uma carência de estudos que envolvem sistemas tristílicos, principalmente no âmbito da história natural. Nesse sentido, é oportuno conhecer o funcionamento da tristilia e os principais fatores que regulam a variação ou manutenção da eficiência reprodutiva entre os morfos. Estudos de história natural também são escassos no âmbito da heterostilia, e a maior parte dos trabalhos apenas enfocam aspectos do sistema reprodutivo e sua relação com a proporção dos morfos na população.

Para Caatinga, os estudos sobre heterostilia são escassos, abrangendo principalmente as famílias botânicas Rubiaceae (Souza et al., 2007), Turneraceae (Barret & Shore, 1985; Schlindwein & Medeiros, 2006), Oxalidaceae (Abreu et al., 2008), Cordiaceae (Machado et al., 2010;), Malvaceae (Machado & Sazima, 2008;) e Sterculiaceae (Debra & Schlindwein, 2008). Em geral, as pesquisas na Caatinga envolvem trabalhos sobre sistemas sexuais, traços florais e sistema reprodutivo das espécies distílicas e tristílicas da Caatinga (Machado, 1990; Machado et al., 2006). Para espécies distílicas por exemplo, há informações sobre a presença ou ausência de reciprocidade floral, grau de autocompatibilidade e de autocompatibilidade intra e intermorfo e proporção dos morfos na população (Noivo & Castro 2010; Souza et al., 2007). Para espécies tristílicas há estudos invocando as descrições quanto à morfologia da família Oxalidaceae, ocorrendo no estado de Pernambuco e identificação das características quanto à distribuição, simetria floral e polimorfismo floral (se homostilia ou tristilia) (Abreu et al., 2008). No entanto, para estudos sobre tristilia que aborde outras questões sobre autocompatibilidade, quebra ou manutenção do sistema de incompatibilidade heteromórfico as informações são escassas. Diante desta carência de informações, é pertinente a realização de estudos sobre a biologia reprodutiva de grupos com tristilia, investigando se a populações possuem uma igual proporção dos morfos (isopleτία) ou desigual proporção dos morfos (anisopleτία), o grau de autocompatibilidade e os fatores envolvidos na manutenção ou alteração da tristilia em sistemas complexos, como o da Caatinga.

## REFERÊNCIAS

- ABREU M.C., CARVALHO R., SALES M.F. (2008) *Oxalis L. (Oxalidaceae) no Estado de Pernambuco, Brasil*. *Acta bot. Bras*, 22 (2), 399-416.
- ARROYO M.T.K., ARMESTO J.J., PRIMACK R.B. (1985) **Community studies in pollination ecology in the high temperate Andes of central Chile II. Effect of temperature on visitation rates and pollination possibilities**. *Plant Systematics and Evolution*, 149, 187-203.
- ARROYO M. T. K., HUMANA A. M., DOMINGUÉZ D., JESPERSEN G. (2012) **Incomplete trimorphic expression, In: *Oxalis compacta* Gill ex Hook. Et Arn. Subsp. *Compacta* in the Central Chilean Andes**. *Gayana Bot* , 69 (1), 88-99.
- AGUIAR, J., LACHER T. E. J., SILVA J.M.C. (2002) The Caatinga, In: MITTERMEIER R.A., MITTERMEIER C.G., GIL P. R., PILGRIM J., FONSECA G.A.B., BROOKS T., KONSTANT W.R. (eds.), *Wilderness: earth's last wild places*. Cemex, Agrupación Serra Madre, México: 174-181 pp.
- BAKER H.G. (1966) **The evolution, functioning and breakdown of heteromorphic incompatibility systems**. *Evolution*, 20, 349-368.
- BARRETT S. C. H., SHORE J. S. (2008) **New insights on heterostyly: comparative biology, ecology and genetics**, In: FRANKLIN-TONG V. E. (eds.), *Self-Incompatibility in Flowering Plants: Evolution, Diversity, and Mechanisms*. Springer-Verlag, Berlin: 3-32 pp.
- BARRETT S.C.H., RICHARDS J.H. (1990) **Heterostyly in tropical plants**. *Memoirs of the New York Botanical Garden*, 55, 35-61.
- BARRETT S.C.H. (2010) **Understanding plant reproductive diversity**. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 365, 99-109.
- BARRETT S.C.H., JESSON L.K., BAKER A.M. (2000) **The evolution and function of stylar polymorphisms in flowering plants**. *Annals of Botany*, 85, 253-265.
- BARRETT, S.C.H. (1992) **Evolution and function of heterostyly**. Springer-Verlag, Berlin.
- BARRETT S.C.H. (1993) The evolutionary biology of tristily, In: FUTUYMA D.J., ANTONOVICS J. (Eds), *Oxford surveys in evolutionary biology*, Vol. 9, Oxford University Press, Oxford, UK: 283–326 pp.
- BARRETT S.C.H., JESSON L.K., BAKER A.M. (2000) **The evolution and function of stylar polymorphisms in flowering plants**. *Annals of Botany*, 85, 253-265.
- BARRETT S.C.H., GLOVER D.E. (1985) **On the Darwinian hypothesis of the adaptative significance of tristily**. *Evolution*, 39 (4), 766-774.
- BRUNET J. (1992) **Sex allocation in Hermaphroditic in plants**. *Tree*, 7(3), 79-83.
- BRUNET J., CHARLESWORTH D. (1995) **Floral sex allocation in sequentially blooming plants**. *Evolution*, 49(1), 70-79

CHARLESWORTH D., CHARLESWORTH B. (1979) **A model for the evolution of distyly.** *The American Naturalist*, 114 (4), 467-498.

CASPER B.B., CHARNOV E. L. (1982) **Sex allocation in heterostylous plants.** *Journal of Theoretical Biology*, 96, 143-149.

CHARLESWORTH D. (1979) **The evolution and breakdown of tristily.** *Evolution*, 33, 489-498.

COSTA J., FERRERO V., CASTRO M., LOUREIRO J., NAVARRO L., CASTRO S. (2016) **Variation in the incompatibility reactions In tristylous *Oxalis pes-caprae*: large-scale screening in South African native and Mediterranean basin invasive populations.** *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 24, 25-36.

COSTA J., FERRERO V., LOUREIRO J., CASTRO M., NAVARRO L., CASTRO S. (2012) **Sexual reproduction of the pentaploid, short-styled *Oxalis pes-caprae* allows the production of viable offspring.** *Plant Biology*, 208-214.

CONSOLARO H. (2008) **A distilia em espécies de Rubiaceae do bioma cerrado.** Tese de Doutorado (Doutorado em Ecologia)- Universidade de Brasília, Brasília: 115 pp.

DARWIN C. (1877) **The different forms of flowers on plants of the same species.** Reprinted in 1986 by University of Chicago Press, Chicago.

DAFNI A., PACINI E., NEPI M. (2005) **Pollen and stigma biology**, in: Dafni A. *et al.* (Eds.), *Practical pollination biology*. Ontario, Canada, Enviroquest, 83-142.

DULBERGER R. (1974) **Structural dimorphism of stigmatic papillae in distylous *Linum* species.** *American Journal of Botany*, 61, 238-43.

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

FAEGRI K., VAN DER PIJL L. (1976) **The principles of the pollination ecology.** Pergamon Press, Oxford.

FAIFE-CABRERA M., FERRERO V., NAVARRO L. (2014) **Unravelling the stylar polymorphism in *Melochia* species (Malvaceae): Reciprocity and ancillary characters.** *Bot J Linn Soc*, 176, 147-158.

FERRERO V., CASTRO S., SÁNCHEZ J.M., NAVARRO L. (2011) **Stigma-anther reciprocity, pollinators and pollen transfer efficiency in populations of heterostylous species of *Lithodora* and *Glandora* (Boraginaceae).** *Plant Systematics and Evolution*, 291, 267-276.

FERRERO V. (2014) **Heterostilia, ¿qué sabemos hasta el momento?** *Ecosistemas*, 23 (3), 23-30

- FERRERO V., BARRETT S.C.H., ARROYO J., NAVARRO L. (2016) **Associations between sex-organ deployment and morf. Bias in related heterostylous taxa with different stylar polymorphisms.** *American Journal of Botany*, 1 (104), 1-12.
- FURTADO M.T.R. A funcionalidade da distília em *Psychotria nitidula* Cham. & Schldl. (Rubiaceae): O papel do polinizador na transferência de pólen. 2015. Dissertação (Mestrado em Botânica)- Universidade de Brasília, Brasília, 2015.
- GANDERS F.R. (1979) **The biology of heterostyly.** *New Zealand Journal of Botany*, 17, 607–635.
- GARDNER A. G., VAIO M., GUERRA M., EMSHWILLER E. (2012) **Diversification of the American bulb-bearing *Oxalis* (Oxalidaceae): dispersal to North America and modification of the tristylous breeding system.** *American Journal of Botany*, **99**, 152-164.
- GOLDMAN D.A., WILLSON M.F. (1986) **Sex Allocation in functionally hermaphroditic plants: A review and critique.** *The Botanical Review*, 52 (2), 157-194
- HEUCH I. (1979) **Equilibrium populations of heterostylous plants.** *Theoretical populations biology*, 15, 43-57.
- HUECK K. (1972) **As florestas da América do Sul: Ecologia composição e importância econômica.** Polígono, São Paulo.
- KOHN J. R., BARRETT S. C. H. (1992) **Experimental studies on the functional significance of heterostyly.** *Evolution*, 46, 43 – 55.
- KRUG C., SILVA C.I., DOS SANTOS I.A. (2012) **Interaction between Bees and the Tristylous flowers of *Oxalis cytisoides* Mart.& Zucc. (Oxalidaceae).** *Psyche*, 1-8.
- LAVOR D.T., RAMOS A.B.B. (2016) **Estudo preliminar das síndromes de polinização em um fragmento de Caatinga, PE, Brasil.** *Biotemas*, 29 (4), 19-30
- LI Q., XU Z., KRESS W., XIA Y., ZHANG L., DENG X., GAO J., BAI Z. (2001) **Flexible style that encourages outcrossing.** *Nature*, 410-432.
- LLOYD D.G., WEBB C.J. (1992) **The evolution of heterostyly,** In: Barrett S.C.H. (Ed.), *Evolution and function of heterostyly.* Springer, Berlin, Germany: 151–178 pp.
- LOURTEIG A. (1983) **Oxalidáceas.** In: R. Reitz (eds.). *Flora Ilustrada Catarinense*, fascículo Oxal, Itajaí, Santa Catarina.
- LOPES A.V.F. (2002) Polinização por beija-flores em remanescente da Mata Atlântica Pernambucana, Nordeste do Brasil. Tese de doutorado (Doutorado em Ecologia)- Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.
- LUO S., ZHANG D., RENNER S.S. (2006) ***Oxalis debilis* in China: Distribution of flower morphs, sterile pollen and polyploidy.** *Annals of Botany*, 98, 459 – 464.

- MACHADO I. C., LOPES A. V. (2003) **Recursos Florais e sistemas de polinização e sexuais na Caatinga**, In: LEAL I. R.; TABARELLI M.; SILVA J. M. C. (Eds.), *Ecologia e conservação da Caatinga*, Recife: Editora Universitária da UFPE, 515-563 pp.
- MACHADO I. C., LOPES A. V. (2004) **Floral traits and pollination systems in the Caatinga, a Brazilian tropical dry forest**. *Annals of Botany*, 94 (3), 365-376.
- MARCO D.E., ARROYO M.T.K. (1998) **The breeding system of *Oxalis squamata*, a tristylous South American species**. *Botanica Acta*, 111, 497-504.
- NICHOLLS M.S. (1986) **Population composition, gender specialization, and the adaptive significance of distyly in *Linum perenne* (Linaceae)**. *New Phytol*, 102, 209-217.
- ORNDUFF R. (1964) **The breeding system of *Oxalis suksdorfii***. *American Journal of Botany*, 51(3), 307-314.
- ORNDUFF R. (1972) **The breakdown of trimorphic compatibility in *Oxalis*, section *Corniculata***. *Evolution*, 26, 52-65.
- PAUW A. (2005) **Inversostyly: a new stylar polymorphism in an oil-secreting plant, *Hemimeris racemosa* (Scrophulariaceae)**. *American Journal of Botany*, 92, 1878–1886.
- PIGOZZO C.M., VIANA B.F. (2010) **Estrutura da rede de interações entre flores e abelhas em ambiente de Caatinga**. *Oecologia Australis*, 14 (1), 100-114.
- SAMPSON D. A., KREBS R. A. (2012) **Quantitative evaluation of reciprocal herkogamy in the distylous species, *Hedyotis caerulea* (Rubiaceae)**. *Plant Systematics and Evolution*, 298, 1361–1370.
- SÁNCHEZ J.M., FERRERO V., ARROYO J., NAVARRO L. (2010) **Patterns of style polymorphism in five species of the South African genus *Nivenia* (Iridaceae)**. *Annals of Botany*, 106, 321–331.
- SÁNCHEZ J.M., FERRERO V., NAVARRO L. (2013) **Quantifying reciprocity in distylous and tristylous plant populations**. *Plant biology*, 616-620.
- SANTOS M.J., MACHADO I.C., LOPES A.V. (2005) **Biologia reprodutiva de duas espécies de *Jatropha* L. (Euphorbiaceae) em Caatinga, Nordeste do Brasil**. *Revista Brasileira de Botânica*, 28 (2), 361-373.
- SHIBAIKE H., ISHIGURI Y., KAWANO S. (1995) **Reproductive biology of *Oxalis corniculata* (Oxalidaceae): Style length polymorphisms and breeding systems of Japanese populations** *Plant Species. Biology*, 10, 83-93.
- STONE J.L., THOMSON J.D. (1994) **The evolution of distyly: pollen transfer in artificial flowers**. *Evolution*, 48, 595-1606.
- TURKETTI S.S., ESLER K.J., DREYER L.L. (2011) **Three-dimensional reciprocity: A new form of tristyly in South African *Oxalis* (Oxalidaceae) species and its implications for reproduction**. *South African Journal of Botany*, 78, 195-202.

WELLER S.G. (1986) **Factors influencing frequency of the mid-styled morph in tristylous populations of *Oxalis alpina***. *Evolution*, 40, 279-289.

WELLER S.G. (1992) Evolutionary modifications of tristylous breeding systems. En: Barrett, S.C.H. (eds.). *Evolution and function of heterostyly*. Springer- Verlag, Berlin, Alemania.

WEBER J.J., WELLER S.G., SAKAI A.K., NGUYEN A., TAI N.D., DOMÍNGUEZ C.A. Y., MOLINA-FREANER F.E. (2012) **Purging of inbreeding depression within a population of *Oxalis alpina* (Oxalidaceae)**. *American Journal of Botany*, 99, 923-932.

VUILLEUMIER B. S. (1967) **The origin and evolutionary development of heterostyly in the angiosperms**. *Evolution*, 21, 210-226.

### 3 ARTIGO

---

**FUNCIONALIDADE DA HETEROSTILIA E EFICIÊNCIA REPRODUTIVA DE  
*OXALIS PSORALEOIDES* MART. EX ZUCC. (OXALIDACEAE): UMA ESPÉCIE  
TRISTÍLICA DA REGIÃO SEMI-ÁRIDA DO BRASIL**

---

Artigo a ser submetido à Revista

*Flora*

**Funcionalidade da heterostilia e eficiência reprodutiva de *Oxalis psoraleoides* mart. Ex zucc. (Oxalidaceae): uma espécie tristílica da região semi-árida do Brasil**

**L. S. Lima, T. F. F. de Sá, S. A. de Lima , A. Domingos-Melo & I. C. Machado**

Departamento de Botânica, Centro de Biociências, Laboratório de Biologia Floral e Reprodutiva, Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Universidade Federal de Pernambuco. Av. Professor Moraes Rêgo, s/n Cidade Universitária. Recife, Pernambuco, Brasil. 50670-901.

**\*Correspondência**

I.C.Machado, Departamento de Botânica, Centro de Biociências, Programa de Pós- Graduação em Biologia Vegetal, Universidade Federal de Pernambuco. Av. Professor Moraes Rêgo, s/n Cidade Universitária. Recife, Pernambuco, Brasil. Cep 50670-901.

E-mail: [icsmachado@yahoo.com](mailto:icsmachado@yahoo.com)

---

## RESUMO

A heterostilia está associada ao polimorfismo das estruturas reprodutivas, podendo haver distília ou tristília, esta última menos frequente e com três tipos florais: brevistilo, longistilo e medistilo. É comum que espécies heterostílicas, incluindo tristília, apresentem um sistema de incompatibilidade heteromórfica, alturas recíprocas nos órgãos sexuais entre os morfos florais e uma razão equilibrada na proporção desses morfos. Este trabalho buscou detectar a variação dos morfos florais em uma população tristílica de *Oxalis psoraleoides* (Oxalidaceae) na Caatinga e analisar os possíveis mecanismos envolvidos. Investigamos a variação da razão dos morfos, a reciprocidade estigma-antera através do índice de inacurácia floral, a frequência de visitantes/polinizadores e avaliamos o sistema reprodutivo da espécie. O tipo floral medistilo ocorre em maior frequência (M-morph = 48,97%), seguido do longistilo (L-morph = 29,59%) e do brevistilo (S-morph = 21,42%). Os valores de hercogamia recíproca representados pela análise da inacurácia variou entre 0,64 e 0,99 mm<sup>2</sup> no órgão baixo (antera L-morph e estigma S-morph) e no órgão alto (antera M-morph com estigma L-morph) respectivamente, sendo 0 o maior grau de reciprocidade entre os órgãos sexuais. A frequência de visitas de lepidópteros (56,58%) foi maior que a de abelhas (43,42%). Em relação ao sistema reprodutivo, só houve formação de frutos no tratamento de polinização cruzada e no controle. No controle, o morfo medistilo formou mais frutos. Embora forme frutos na polinização cruzada ilegítima, *O. psoraleoides* não foi considerada autocompatível. Concluímos que a tristília mantém um elevado grau de hercogamia recíproca quando comparado com outras espécies heterostílicas e um sistema autointramorfo incompatível. Acreditamos que as alterações no sistema de incompatibilidade heteromórfico, observadas pela presença de cruzamentos ilegítimos, não foi um fator determinante para a ocorrência de anisopleia na população e consideramos *O. psoraleoides* uma espécie tristílica atípica, pela desproporção entre os morfos e desvios nos graus de compatibilidade, com formação de frutos entre estruturas de níveis diferentes. Por fim, sugerimos que o sistema de polinização generalista possa estar interferindo no desbalanceamento dos três morfos, sustentado pelo fato de só haver formação de frutos nos cruzamentos legítimos e ilegítimos intermorfos.

**Palavras-chave:** Caatinga; Sistema Incompatibilidade Heteromórfico (SIH), hercogamia recíproca, heterostilia, polinização mista, anisopleia.

## ABSTRACT

Heterostyly is associated with polymorphism of the reproductive structures, and there can be distyly or tristily, the latter less frequent and with three floral types: short-, mid- and long-styled. It is common for heterostylous species, including tristily, to have a heteromorphic incompatibility system, reciprocal heights in the sexual organs between floral morphs, and a balanced ratio in the proportion of these morphs. This work aimed to detect the variation of floral morphs in a tristylous population of *Oxalis psoraleoides* (Oxalidaceae) in Caatinga and analyze the possible mechanisms involved. We investigated the variation of the morph ratio, the stigma-anther reciprocity through the floral inaccuracy index, the frequency of visitors/pollinators and evaluated the reproductive system of the species. The mid-styled floral type occurs most frequently (M-morph = 48.97%), followed by long-styled (L-morph = 29.59%) and short-styled (S-morph = 21.42%). The reciprocal herkogamy values represented by the inaccuracy analysis ranged between 0.64 and 0.99 mm<sup>2</sup>, in the low organ (L-morph anther and S-morph stigma) and the high organ (M-morph anther with L-morph stigma) respectively, with 0 being the highest degree of reciprocity between sexual whorl levels. The frequency of Lepidoptera visits (56.58%) was higher than that of bees (43.42%). Regarding the reproductive system, fruit formation only occurred in the cross-pollinated treatment and in the control. In the control, the mid-styled produced more fruits. Although it forms fruit in illegitimate cross-pollination, *O. psoraleoides* was not found to be self-compatible. We conclude that tristily maintain a high degree of reciprocal herkogamy when compared to other heterostylous species and an incompatible self-intramorphic system. We believe that the alterations in the heteromorphic incompatibility system, observed by the presence of illegitimate crosses, was not a determining factor for the occurrence of anisoplety in the population and we consider *O. psoraleoides* an atypical tristily species, by the disproportion between morphs and deviations in the degrees of compatibility, with fruit formation between structures of different levels. Finally, we suggest that the generalist pollination system may be interfering with the imbalance of the three morphs, supported by the fact that there is only fruit formation in legitimate and illegitimate intermorph crosses.

**Key-words:** Caatinga; Heteromorphic Incompatibility System (SIH), reciprocal herkogamy, heterostyly, mixed pollination, anisoplety.

## INTRODUÇÃO

A heterostilia é uma estratégia reprodutiva presente nas angiospermas que permite reduzir ou evitar a autopolinização e favorecer a polinização cruzada (Barrett et al., 2000). A evolução da separação espacial e temporal das funções sexuais e autoincompatibilidade resultou em mecanismos como a hercogamia recíproca (HR) e o sistema de incompatibilidade heteromórfico (SIH) (Lloyd and Webb, 1986; Webb and Lloyd, 1986; Barrett et al., 2000; Barrett, 2019). Enquanto a HR refere-se à reciprocidade no comprimento/altura dos estiletos e estames entre morfos florais, o SIH refere-se a compatibilidade entre estruturas reprodutivas com níveis semelhantes. Nesse sistema, cruzamentos legítimos são aqueles que ocorrem entre estruturas reprodutivas do mesmo nível (mesma altura do estame e estilete) e de morfos diferentes (Castro et al., 2007; Barrett, 2019).

Dentro da heterostilia existem duas possibilidades de expressões morfológicas, a distília e a tristília, sendo a primeira mais comum, ocorrendo aproximadamente em 28 famílias de Angiospermas (Barrett and Shore, 2008), e a segunda ocorrendo em apenas sete famílias (Barrett, 1993; Thompson et al., 1996; Weller, 1992; Weller et al., 2007). As espécies tristílicas caracterizam-se por apresentar três morfos florais (brevistilo, mediostilo e longistilo), cada um com dois níveis de estames (Charlesworth, 1979; Weber et al., 2012; Barrett, 2019). Assim como a HR e o SIH, outra característica esperada na tristília envolve uma proporção isoplética dos morfos florais, na qual cada indivíduo apresenta um tipo de morfo, sendo a frequência esperada dos indivíduos, uma razão equilibrada de 1:1:1 entre os morfos de espécies tristílicas (Bir-Bahadur, 1968; Weller et al., 2015).

Desvios de características no HR e SIH podem resultar em alterações nas alturas das estruturas reprodutivas e cruzamentos ilegítimos entre estames e estiletos de alturas diferentes e de mesmo morfo configurando o sistema como heterostilia atípica (Ganders, 1979; Arroyo et al., 2012; Barrett, 2019). Como consequência, pode haver a formação de populações anisopléticas ou mesmo o desaparecimento de alguns dos morfos e formação de populações dimórficas ou monomórficas em espécies comumente tristílicas (Weller et al., 2015; Castro et al., 2013; Turketti, 2010).

Alguns estudos sugerem que as mudanças consequentes dos desvios nas espécies polimórficas são respostas aos diferentes grupos de polinizadores, que possuem um papel crítico na manutenção da heterostilia, especialmente na expressão do polimorfismo do estilete (Cesaro and Thompson, 2004; Pérez-Barrales and Arroyo, 2010; Simón-Porcar et al., 2014). Nesse contexto, ao elencarmos os sistemas de polinização ocorrentes em espécies com tristília, são

encontrados principalmente casos de especialização para melitofilia, incluindo a interação com abelhas de grupos como *Apidae*, *Halictidae* e *Megachilidae* (Krug et al., 2012) e, em menor ocorrência, sistemas de psicofilia (Vogel, 1954; Ferrero et al., 2011; Costa et al., 2016). Tais sistemas especializados contribuem para a precisão do encaixe flor-polinizador, favorecendo fluxo de pólen legítimo através de estruturas reprodutivas diametralmente opostas umas às outras e/ou com maior reciprocidade entre suas alturas (Barrett, 1992; Marco and Arroyo, 1998; Barrett, 2010).

Para espécies tristílicas há ainda a possibilidade de sistemas mistos de polinização, envolvendo tanto abelhas quanto lepidópteros, os quais podem ser uma condição desafiadora na manutenção da heterostilia, visto que visitantes diferentes geram pressões seletivas distintas sobre a forma das flores, o que poderia comprometer a funcionalidade da reciprocidade entre as morfologias dentro de um mesmo polimorfismo floral (Armbruster, 2017; Muchhala, 2007; Santos-Gally et al., 2013). Embora se saiba que sistemas mistos funcionam como uma maneira de compensação adaptativa mantendo populações mesmo diante da baixa frequência de polinizadores especializados, ainda não está claro como esse processo ocorre em espécies heterostílicas (Ollerton et al., 2007; Muchhala, 2006). Deste modo, pesquisas que busquem entender como se dá a manutenção de polimorfismos florais heterostílicos, como a tristilia, diante de sistemas mistos de polinização são interessantes para preencher essa lacuna de conhecimento.

Ante o exposto, investigamos a ecologia da polinização de *Oxalis psoraleoides* L., uma espécie de Oxalidaceae presente na floresta seca da Caatinga, e cujas observações prévias nossas sugerem um sistema de polinização misto envolvendo tanto hymenopteros quanto lepidópteros. Tomando essa espécie como modelo, o objetivo deste trabalho foi compreender a funcionalidade da tristilia em uma população sabidamente generalista. Inicialmente descrevemos em detalhes quais são os seus visitantes florais e suas contribuições relativas para a polinização da espécie em termos quantitativos, ie. frequência de visitas. Em seguida, buscamos responder às seguintes perguntas, diretamente relacionadas ao funcionamento da tristilia na população estudada: 1) Há isopleitia na população estudada de *O. psoraleoides*? 2) Existe diferença nos graus de hercogamia das estruturas reprodutivas entre os diferentes níveis? 3) Há manutenção do Sistema de Incompatibilidade Heteromórfico clássico (SIH) esperado para plantas heterostílicas, e como a eficiência reprodutiva difere entre os morfos? 4) A população estudada apresenta características de tristilia típica? 5) Caso contrário, a presença de

um sistema de polinização generalista pode facilitar o surgimento de características atípicas na população de *O. psoraleoides*?

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Local de estudo e espécie estudada*

O presente trabalho foi realizado entre o período de fevereiro de 2017 a fevereiro de 2018 com uma extensa população de *O. psoraleoides* em uma vegetação de Caatinga na Vila Batinga (S 08°31'32.9" W 037°17'02.5" elevação: 877m), localizada dentro do Parque Nacional Vale do Catimbau (PARNA Catimbau, Buíque, Pernambuco - IBAMA 2002).

Oxalidaceae é uma das sete famílias de angiospermas que apresenta tristílica (Barrett, 1993; Thompson et al., 1996; Weller, 1992; Weller et al., 2007). O gênero *Oxalis* L. é o maior da família e compreende cerca de 800 espécies (Lourteig, 1983), das quais 114 ocorrem no Brasil (Costa et al., 2012). Nessa família são observadas tanto espécies tristílicas como distílicas, além de algumas com características atípicas, como espécies homostílicas, nas quais as flores têm estiletos de igual comprimento no mesmo ou em indivíduos diferentes na mesma espécie (Vuilleumier, 1967). *O. psoraleoides* é uma espécie tristílica, que ocorre amplamente em florestas tropicais secas na Caatinga (Abreu et al., 2008). Observações prévias identificaram a presença de diferentes visitantes florais (abelhas e lepidópteros), o que a torna um bom modelo para entender como se dá o papel da tristílica no sucesso reprodutivo em um sistema generalista.

### *Sequência de antese e frequência de visitantes florais*

Para analisar a sequência de antese e longevidade floral de *O. psoraleoides* foram marcados botões florais em campo (n=45 botões; 15 botões/morfo; n=3 botões/indivíduo/morfo; n= 5 indivíduos/morfo), sendo registrados os horários de: i) início da abertura floral, ii) distensão máxima das pétalas, iii) início da deiscência das anteras, iv) perda de turgidez do estigma, v) início do fechamento, vi) murcha completa e vii) receptividade do estigma, através de testes de coloração com permanganato de potássio (KMNO<sub>4</sub>), registrando os horários em que os estigmas de cada morfo apresentaram-se receptivos.

Uma vez determinada a sequência de antese, foram realizadas observações em campo para registro da frequência e comportamento dos visitantes nos três tipos de flores. Tais observações foram realizadas em 15 flores de 15 indivíduos abarcando os diferentes morfos (n=5 para cada morfo floral) durante cinco dias consecutivos (das 6:00 às 15:00 hs) totalizando um esforço amostral total de 45h. Durante esse período registramos o horário de todas as visitas realizadas, a espécie/morfotipo de inseto que realizou a visita, o tipo de recurso floral

consumido (pólen ou néctar), e inferimos a efetividade da visita como polinizador, com base no contato com as estruturas reprodutivas e transferência de pólen para o estigma. Para auxiliar a descrição do comportamento durante as visitas, fizemos fotos com uma câmera digital (*Canon DSLR EOS Rebel T3i, com lente 18-55 mm*).

Nos dias subsequentes às observações de visitas ( $n= 5$  dias;  $n= 45$  h diurnas de esforço amostral), sempre que possível, coletamos exemplares de visitantes para fins de identificação. Eles foram capturados e colocados em uma câmara mortífera com acetato de etila, sendo posteriormente montados a seco, identificados e depositados na Coleção de Insetos Polinizadores do Laboratório de Biologia Floral e Reprodutiva (Departamento de Botânica-UFPE). As curvas de frequência de visitas ao longo da antese nos três morfos florais foram comparadas entre os dois principais grupos de polinizadores (Hymenopteros e Lepidópteros), por meio do teste Kolmogorov-Smirnov, usando o programa Sigma Plot 14.0.

#### *Quantificação dos morfos florais*

A quantificação dos morfos foi feita a partir de uma busca ativa ao longo de uma população, adicionando também alguns indivíduos isolados ao longo da distribuição populacional. Em seguida, realizamos a contagem e calculamos a porcentagem dos indivíduos brevistilos, medistilos e longistilos, para avaliar a presença de isopleτία ou anisopleτία (desigual proporção entre os morfos) (modificado de Castro et al., 2007). O teste G foi utilizado para análise de proporção, por meio do programa Sigma Plot 14.0.

#### *Morfometria floral e Hercogamia recíproca (Índice de Inacurácia)*

Para realização da morfometria floral, coletamos flores e botões florais ao acaso e os fixamos em álcool 70% ( $n=60$  flores/10 indivíduos brevistilos, 10 longistilos e 10 medistilos). As medidas foram realizadas com um paquímetro digital (Leetools; precisão:  $\pm 0,02$  mm; escala de medição: 0-150 mm). As dimensões mensuradas foram: comprimento do tubo floral, largura floral no ápice e medidas das estruturas reprodutivas (pistilo e estame) para cada nível de pistilo (pistilo longo, médio e curto) e nível de estame (longo, médio ou curto).

A partir das medidas de morfometria calculamos a hercogamia recíproca (HR), através do índice de inacurácia floral proposto por Armbruster et al. (2009, 2017) (Fig. 01). Esse índice mede o quanto a média de um órgão reprodutivo afasta-se do seu ótimo, bem como considera a variância desse ótimo como a faixa onde é possível haver transferência legítima de pólen entre

os morfos florais. Para flores tristíficas, esse ótimo é determinado pelas distâncias operacionais médias das anteras e estigmas pertencentes a um mesmo nível (ie. a distância operacional ótima do estigma é igual a distância média da antera, e vice-versa) (Fig. 01). Assim, quanto mais semelhantes forem essas distâncias, maior a possibilidade de transferência legítima de pólen (Armbruster et al., 2017).

Realizamos o cálculo da inacurácia para cada um dos três níveis de estames/pistilos (baixo, médio e alto). No nível alto, avaliamos a correspondência entre a altura do estigma do morfo longistilo com a altura das anteras: altura do morfo brevistilo (Eqn 1) e altura do morfo medistilo (Eqn 2) (Fig. 01). No nível médio, avaliamos a correspondência da altura do estigma do morfo medioestilo com a altura das anteras: média do morfo brevistilo (Eqn 3) e média do morfo longistilo (Eqn 4) (Fig. 01). Por fim, no nível baixo avaliamos a correspondência da altura do estigma do morfo brevistilo com a altura das anteras: altura baixa do morfo medioestilo (Eqn 5) e altura baixa do morfo longistilo (Eqn 6) (Fig. 01). A partir dessas relações as equações descritas abaixo foram aplicadas para cada nível supracitado:

$$\text{Inaccuracy}_{\text{low organs}} = (\bar{a}_1 - \bar{s}) + V_{a1} + V_s \quad \text{Eqn 1}$$

$$\text{Inaccuracy}_{\text{low organs}} = (\bar{a}_2 - \bar{s}) + V_{a2} + V_s \quad \text{Eqn 2}$$

$$\text{Inaccuracy}_{\text{mid organs}} = (\bar{A}\bar{a}_1 - \bar{S}\bar{s}) + V_{Aa1} + V_{Ss} \quad \text{Eqn 3}$$

$$\text{Inaccuracy}_{\text{mid organs}} = (\bar{A}\bar{a}_2 - \bar{S}\bar{s}) + V_{Aa2} + V_{Ss} \quad \text{Eqn 4}$$

$$\text{Inaccuracy}_{\text{high organs}} = (\bar{A}_1 - \bar{S})^2 + V_{A1} + V_S \quad \text{Eqn 5}$$

$$\text{Inaccuracy}_{\text{high organs}} = (\bar{A}_2 - \bar{S})^2 + V_{A2} + V_S \quad \text{Eqn 6}$$

Onde A, Aa e a, são as alturas médias das anteras dos estames altos, médios e baixos respectivamente. S, Ss e s, são as alturas médias dos estigmas longistilo, medistilo e brevistilo. V é a variância da altura do estigma e da antera do respectivo órgão avaliado. Calculamos a média da inacurácia separadamente nos três níveis (baixo, médio e alto) a fim de facilitar o entendimento de qual nível apresenta maior hercogamia recíproca na espécie estudada. Quanto mais próximo de 0, menor será o valor da inacurácia floral, sendo 0 a reciprocidade perfeita (Armbruster et al., 2017). O índice da inacurácia floral aqui utilizado é importante para entender o grau de convergência entre as anteras e pistilos dentro e entre morfos e, entre níveis de anteras em morfos diferentes. Através do entendimento sobre a reciprocidade das estruturas reprodutivas, podemos discutir a relação entre a convergência dos órgãos florais com a frequência de visitas e o sistema reprodutivo de *O. psoraleoides*.

*Sistema de Incompatibilidade Heteromórfico (SIH) e Sucesso reprodutivo*

A fim de verificar se o SIH se mantém na população estudada de *O. psoraleoides*, bem como comparar o sucesso reprodutivo de flores brevistilas, longistilas e mediostilas, realizamos uma série de tratamentos de polinização manual (Fig. 02). Para cada experimento foram utilizadas 48 flores (quatro botões por indivíduo, totalizando 12 indivíduos). Os botões florais foram previamente ensacados com sacos de voil em seu estágio de pré-antese, para evitar danos externos durante seu desenvolvimento (Fig. 02). Para as eventuais deposições manuais de pólen, foram utilizadas pinças esterilizadas. Após as manipulações dos tratamentos, as flores permaneceram ensacadas para evitar a interferência de fatores externos e posterior erros na interpretação dos dados (Fig. 02). Ao total foram realizados dez tipos de tratamentos os quais foram repetidos em cada um dos três morfos. Foram eles: Agamospermia (Remoção de todos os estames (emasculação) em botões em fase de pré-antese); Autopolinização espontânea e Manual; as diferentes combinações possíveis para Polinização Cruzada (envolvendo cruzamentos intra e intermorfos, legítimos e ilegítimos); e polinização Natural (Fig. 02).

Para análise do sistema reprodutivo, utilizou-se um Modelo Linear Generalizado (GlmM-TMB) sendo aplicada uma distribuição binomial com a função *logit*. Foram utilizados como variáveis explicativas os tratamentos de polinização e morfos, como variáveis aleatórias os indivíduos e como variável resposta a proporção de frutos formados. Devido aos dois níveis de anteras em cada morfo, realizamos um teste estatístico para o tratamento intermorfo a fim de avaliar a produção de frutos de cada nível de antera, utilizando modelo linear generalizado (Glmer). Foram utilizados como variáveis o efeito morfo e o nível de antera como fator fixo, os indivíduos como fator aleatório e a taxa de proporção de frutos formados, como variável resposta. As diferenças estatísticas de cada fator foram testadas utilizando anova do tipo II, seguida do ajuste de *Tukey* para obter valor dentro de cada fator, utilizando o pacote *lsmeans* (pacote *emmeans*; Lenth 2017). Todas as análises estatísticas foram realizadas com o programa R (R Core Team 2017).

A partir desses dados, foram calculados os índices de Eficiência reprodutiva (IER) e o índice de Autoincompatibilidade (IAI). O IER foi dado pela razão entre os frutos formados pelo grupo controle e os frutos oriundos da polinização cruzada intermorfo, sendo que valores próximos a 1 indicam maior eficiência dos polinizadores (Bullock 1985). O IAI foi dado pela razão entre os frutos formados após o tratamento de autopolinização e os frutos formados após o tratamento de polinização cruzada intermorfo. Neste índice, resultados maiores ou iguais a 0,25 indicam um desvio para a autocompatibilidade (Bullock 1985).

## RESULTADOS

### *Sequência de antese e frequência de visitantes florais*

A abertura das flores iniciou entre 4:30h e 5:30h, no entanto a distensão máxima das pétalas e início da deiscência das anteras ocorreu apenas entre 5:40-6:40h e 7:10-8:10h, respectivamente. Os estigmas dos três morfos ficaram receptivos entre 7:00-11:00h (Fig 03: A e B). A perda de turgidez dos estigmas e senescência das flores ocorreu entre 10:10-12:10h e 10:20-11:40h respectivamente, culminando no fechamento das flores, que ocorreu por volta das 15:00h (Fig. 03).

Seguindo um critério quantitativo de frequência dos polinizadores, as flores de *O. psoraleoides* foram visitadas por borboletas, abelhas, moscas e beija-flores, totalizando 6.464 visitas durante 5 dias e 45h de observação (Fig 04; Tab.01). O grupo dos Lepidopteros foi o mais frequente, totalizando 3.636 visitas, ou seja, 56.25%. O segundo grupo mais frequente foi o dos Hymenoptera que somaram 2.788 visitas (43.13%), sendo *Apis mellifera* a espécie que apresentou maior quantidade de visitas (Tab. 01). Em menor frequência foram observadas as visitas de moscas (Diptera: *Bombyliid sp*; n=26; 0.40%) e de beija-flores (Apodiformes: *Chlorostilbon lucidus*; n=16; 0.25%) (Tab. 01)

Em geral, a maior parte das visitas ocorreu entre 8:00h e 12:00h, e após isso foi observado um declínio acentuado na frequência total de visitas (Fig.05). Contudo, as curvas de frequência de visita ao longo da antese diferiram entre os dois principais grupos, Hymenoptera e Lepidoptera (Kolmogorov- Smirnov:  $g_l=2$ ;  $x^2=2121.0424$ ;  $p<0.01$ ). As primeiras visitas às flores eram feitas pelos beija-flores e abelhas *Apis mellifera* (Apidae), entre 5:30h e 7:00h. Para os Hymenoptera em geral, o pico de visita ocorreu entre 8:00 às 10:00h (Tab 02). Em contrapartida, os Lepidópteros começaram as visitas por volta das 07:00h, apresentaram uma maior quantidade de visitas das 10:00 às 12:00h e menor frequência em torno das 14:00 h (Fig.05: A e B; Tab.02).

### *Quantificação dos morfos na população*

Na população estudada (98 plantas), *O. psoraleoides* apresentou 48 indivíduos medistilos (49%), seguido de 29 longistilos (30%) e 21 (21%) brevistilos distribuídos ao longo de uma área de Caatinga aberta. A diferença estatística entre os morfos florais caracterizou a população estudada como anisoplética ( $G: 5.703$ ,  $P=<0.0001$ ).

### *Morfologia floral e Hercogamia recíproca (Índice de Inacurácia)*

Em *O.psoraleoides*, os morfos tristílicos se diferenciam pela altura recíproca em que se encontram os estames e estiletes (HR), sendo cada morfo tristílico caracterizado pela presença de dois níveis de estames: em um morfo o estilete é curto e os estames são longos e intermediários (morfo brevistilo); em um segundo morfo, o estilete é intermediário e os estames são longos e curtos (morfo mediostilo), e no terceiro morfo o estilete é longo e os estames são intermediários e curtos (morfo longistilo) (Fig. 06). Nesse contexto, em relação às medidas morfométricas das flores de *O. psoraleoides* foi verificado que os estames apresentam medidas morfológicas bem definidas, variando de 2.46mm a 5.28mm, nos estames curtos e longos respectivamente (Fig. 07; Tab. 03). A altura do pistilo variou entre 1.89mm a 5.53mm no pistilo curto e no pistilo longo respectivamente (Tab 03). Essas medidas foram testadas na análise de hercogamia recíproca através do índice de inacurácia adiante apresentado na tabela 04.

A média da inacurácia diferiu fracamente entre os órgãos com valor mínimo de 0,7 mm<sup>2</sup> e máximo de 0,9 mm<sup>2</sup>. No entanto, comparando os valores entre si percebemos que os órgãos baixos apresentam valores menores da inacurácia floral, representando assim o nível com maior grau de hercogamia recíproca, seguida do nível médio e por fim do nível alto (Tab 04).

### *Sistema de Incompatibilidade Heteromórfico e Sucesso reprodutivo*

Em relação aos experimentos de polinização, apenas os tratamentos controle e polinização cruzada intermorfo formaram frutos, não havendo formação de frutos nos tratamentos intra-morfo, auto polinização espontânea e auto-polinização manual (Fig 08; Tab. 05). No experimento de polinização cruzada intermorfo, houve formação de frutos tanto nos cruzamentos legítimos quanto ilegítimos (Tab. 05). Ao analisar a produção de frutos na polinização cruzada, somente foi verificado diferença na produção de frutos entre os morfos, independentemente do nível de antera doadora de pólen (Tab. 05). No cruzamento intermorfo legítimo a produção foi maior no morfo mediostilo, seguido do longistilo e brevistilo (Fig 08; Tab. 05).

Em relação aos resultados estatísticos dos cruzamentos florais, não houve diferença significativa entre os tratamentos, no entanto a produção de frutos diferiu entre os morfos. Para os tratamentos de polinização cruzada legítima e ilegítima, houve diferença significativa entre morfos, porém quando comparado entre os níveis de estames os resultados indicaram diferenças significativas (Fig 08; Tab. 06). O índice de autocompatibilidade para todos os morfos foi zero, devido à ausência de frutos formados em experimentos do tipo autoespontâneo e automanual.

Por sua vez, o valor encontrado para o Índice de Eficiência Reprodutiva foi maior que 1 em todos os morfos (brevistilo: 1.46; medistilo: 1.2; longistilo: 1.35), indicando que os polinizadores são eficientes no transporte de pólen e que o sucesso reprodutivo dos morfos florais depende desses agentes polinizadores.

## DISCUSSÃO

Nossos resultados traçam um panorama geral sobre a biologia floral e reprodutiva de *O. psoraleoides* que nos permite apontar a presença de tristilia atípica, uma vez que a proporção entre os três morfos florais não é semelhante, caracterizando uma anisopleτία. Constatamos uma similaridade entre os níveis de inacurácia floral dos morfos florais e por fim a presença de um sistema generalista de polinizadores, o qual pode estar moldando a tristilia atípica. Apesar de autoincompatível, *O. psoraleoides* demonstrou formar frutos na polinização cruzada ilegítima, ou seja, entre diferentes níveis de anteras e estigmas entre os morfos, configurando casos atípicos para o esperado em tristilia. A seguir, discutimos a relação entre a proporção dos morfos comparando com os ajustes mecânicos e reprodutivos da espécie. Por fim, levantamos possíveis questionamentos acerca das mudanças encontradas na população estudada de *O. psoraleoides*.

A presença de anisopleτία em *O. psoraleoides* se caracteriza pela redução do morfo brevistilo na população. Esses resultados indicaram o morfo brevistilo como o morfotipo que mais desaparece na população, semelhante ao encontrado para *Lythrum salicaria* (Heuch, 1980); *Turnera ulmifolia* L. var. *angustifolia* (Barrett, 1989) e *Oxalis pes-caprae* L. (Costa et al., 2016). No entanto, o estudo de Chen et al. (2007), no qual há a descrição da perda do morfo longistilo no gênero *Oxalis*, representando outro caso de variabilidade da proporção dos morfos. Contudo para o gênero *Oxalis*, o padrão recorrente é que o morfo brevistilo seja mais frequente, quando ocorrer populações trimórficas (Weller, 1981; Castro et al., 2007; Castro et al., 2013). Por sua vez, em populações monomórficas é mais frequente a ocorrência do morfo mediostilo ou brevistilo, enquanto em populações dimórficas o mediostilo é ausente (Luo et al., 2006). Até o momento, há registros de diversas populações de *Oxalis* que apresentam variações na frequência dos três morfos (brevistilo, mediostilo e longistilo) (Turketti et al., 2011; Castro et al., 2013), e casos em que há ocorrência de distilia ou tristilia em populações da mesma espécie, mas em áreas diferentes (Weller et al., 2015). Apesar da população estudada ser considerada anisoplética, descartamos a possibilidade de transição da tristilia para distilia (eg. *Oxalis alpina*, Weller et al., 2007) em *O. psoraleoides*, uma vez que o morfo mediostilo representa o

dobro da frequência dos morfos brevistilo e longistilo, sendo a distília caracterizada pela presença dos morfos longistilo e brevistilo (Barrett and Shore, 1987; Barrett, 2019).

Vários são os fatores que podem influenciar na frequência dos morfos florais, dentre eles, os movimentos estocásticos, como por exemplo, deriva gênica, perda da heterozigose, depressão endogâmica, variações inter-anuais do clima, variações na disponibilidade de recursos, dentre outros (Weber et al., 2013; Ferrero et al., 2016). Em *Oxalis pes-caprae*, por exemplo, foi observado que 89% de 55 populações estudadas eram monomórficas (com a maior parte delas contendo o morfo brevistilo), e 10.9% eram dimórficas, contendo variação da frequência dos morfos longistilos e brevistilos (n=47 morfos dimórficos) e perda do morfo mediestilo (Castro et al., 2007). Esse cenário não é encontrado na população de *O. psoraleoides* no presente estudo e de acordo com a literatura e com os dados aqui apresentados, acreditamos que a mudança atípica na frequência dos morfos é resultado da variação no sistema reprodutivo na população aliado à atuação de diferentes espécies de polinizadores, semelhante ao descrito em Sosenski et al. (2015) para *Oxalis alpina* (Rose) Rose ex. R. Knuth e *Narcissus triandrus* L.

O complexo sistema reprodutivo em espécies tristílicas com dois níveis de antera em cada morfo pode atuar em 24 tipos de cruzamentos entre autopolinização, polinização intramorfo e intermorfo (Barrett, 1993). De acordo com a literatura e comparando os resultados encontrados no presente estudo, *O. psoraleoides* expressa características não esperadas para uma espécie tristílica, uma vez que mesmo não sendo auto intramorfo compatível, formou fruto na polinização cruzada ilegítima, oriunda do cruzamento entre morfos e níveis de estames e estiletos não recíprocos. Variações no sistema de incompatibilidade parecem ser comuns no gênero *Oxalis* (Marco and Arroyo, 1998; Pacques de Barro Pacheco and Coleman, 1989; Luo et al., 2006; Castro et al., 2007; Weller et al., 2007; Abid, 2010), no entanto, não se sabe se a tristília é sustentada pelo sistema heteromórfico de incompatibilidade (Arroyo et al., 2012). Esse tipo de cruzamento ilegítimo representa instabilidade no sistema tristílico (Charlesworth, 1979), resultando em uma nova configuração fenotípica e aumentando as chances de transferência de pólen compatível (Sosenski et al., 2010). Dessa forma, a produção de frutos em cruzamentos ilegítimos é um fato não esperado em sistemas tristílicos, porém parece ser recorrente em várias espécies heterostílicas (Ornduff, 1972; Barrett, 1989; Colautti et al., 2010). Além disso, o resultado encontrado no presente estudo se relaciona com dados da literatura em que variações no sistema de incompatibilidade heteromórfico parece estar correlacionado com alterações na razão dos morfos (Pailler and Thompson, 1997; Brys et al., 2008; Hodgins and Barrett, 2008).

Ao analisarmos a produção de frutos no tratamento controle, constatamos que o morfo mediostilo é beneficiado com a transferência de pólen intermorfo, seja por polinização cruzada ilegítima ou legítima. Essa afirmação é sustentada pelo fato do morfo mediostilo ter tido uma maior produção de frutos naturalmente. Curiosamente, além de uma maior produção de frutos no morfo mediostilo, a presença de anisopleitia na população de *O. psoraleoides* foi verificada por uma maior quantidade de indivíduos nesse morfotipo. Apesar de especulativo, não podemos descartar a relação a longo prazo do sucesso na produção de fruto no tratamento controle no morfotipo mediostilo e a colonização de indivíduos mediostílicos na população de *O. psoraleoides*. Por fim, essas variações na produção de fruto nem sempre podem ser provenientes de variações nos graus de hercogamia recíproca (Turketti, 2010) mas no sistema de polinização mista, discutidas adiante.

Utilizamos a análise da inacurácia desenvolvida por Armbruster et al. (2017) para avaliar os graus de reciprocidade entre os morfos. A nossa análise mostrou que os graus de hercogamia recíproca entre morfos são muito semelhantes indicando que todos os morfotipos florais tem chances similares em receber pólen legítimo da polinização cruzada, partindo do pressuposto que os polinizadores são eficientes (Armbruster et al., 2017). Apesar dos trabalhos adotarem outros métodos para avaliar a hercogamia recíproca, espécies do gênero *Oxalis* frequentemente apresentam altos graus de reciprocidade, como registrado em *O. compacta* (Arroyo et al., 2012) e *O. alpina* (Weller et al., 2015). Esses graus de hercogamia recíproca podem variar; no entanto, a literatura reforça que em sistemas com forte hercogamia recíproca (reciprocidade entre as estruturas reprodutivas) é esperada uma proporção igual ou aproximada entre os morfos florais (isopleitia) (Webb and Lloid, 1986; Barrett and Richards, 1990). O presente estudo encontrou um baixo valor de inacurácia floral, o que reflete um alto grau de reciprocidade quando comparado com avaliações em outras espécies heterostílicas (Armbruster et al., 2017; Jacquemyn et al., 2018). Mesmo com o alto grau de hercogamia recíproca, a população de *O. psoraleoides* apresentou anisopleitia não havendo uma relação forte entre reciprocidade e razão dos morfos. Com isso, verificamos que para essa população estudada nem sempre haverá uma estreita relação entre hercogamia recíproca e razão dos morfos na população.

Descartando a influência da reciprocidade na razão dos morfos e sustentado pela literatura, sugerimos que as mudanças atípicas nas espécies heterostílicas podem ser sustentadas pela ação de polinizadores generalistas em transferir pólen legítimo entre morfos (Santos-Gally et al., 2013; Da Cunha et al., 2014). Por outro lado, *O. psoraleoides* apresenta características morfológicas para ação de polinizadores especialistas, através de uma polinização mais

comumente por abelhas (melitofilia), e apresentando características florais como a presença de display floral atrativo, devido às flores amarelas, oferta de pólen abundante e tubo floral em formato de sino (Darwin, 1877; Faegri and Pijl, 1979). Sendo assim, a especificidade das interações foi alterada diante do cenário de queda de polinizadores especializados que resultam em alterações do sistema de incompatibilidade, e por extensão a formação de cruzamentos ilegítimos (Baena-Díaz et al., 2012) e proporções anisopléticas, com aumento ou diminuição de um dos morfos na razão floral (Sosenski et al., 2015).

Uma explicação alternativa para o aumento na frequência do morfo mediostilo poderia ser o sistema de polinização generalista encontrado para *O. psoraleoides*. De fato, pouco se tem investigado uma possível relação entre os sistemas de polinização na manutenção da tristilia, sendo observados mais trabalhos que correlacionam experimentos de sistema reprodutivo (do tipo autopolinização e cruzamentos legítimos e ilegítimos) com a proporção da frequência dos morfos (Costa et al., 2012; Castro et al., 2013). Assim como a autocompatibilidade, sistemas generalistas podem ser vistos como uma forma de segurança reprodutiva em locais onde seja difícil manter a constância de polinizadores especializados (Allee et al., 1949; Arroyo et al., 2012; Faife-Cabrera et al., 2014). Além disso, possuir diversos tipos de visitantes florais pode otimizar ou manter o fitness reprodutivo da planta, pois a possibilidade de receber diversos tipos de visitantes ao longo de sua antese pode resultar também na probabilidade de maior fluxo de pólen, em função dos diversos contatos dos visitantes com as estruturas reprodutivas (Domínguez, 2010). Por outro lado, essa menor especificidade planta-animal gera um menor pareamento ou ajuste morfológico das flores com os visitantes florais (Consolaro et al., 2011).

Considerando que a tristilia é um polimorfismo do estilete que aumenta o ajuste morfológico com os polinizadores, seria esperado que essa condição estivesse associada aos sistemas especialistas de polinização (Darwin, 1877; Baena-Díaz et al., 2012). Dessa forma, haveria um aumento da probabilidade de fluxo de pólen legítimo entre os morfos, devido às variações morfológicas presentes na tristilia, refletidas no comprimento dos estames e estiletos (Barrett, 1992; Cunha, 2013). No entanto, em algumas espécies heterostílicas, pode haver casos de sistemas generalistas de polinização, nos quais visitantes florais não especializados sejam capazes de transferir pólen legítimo entre os morfos e manter níveis razoáveis de polinização cruzada (Cunha, 2013; Wolf and Barrett, 1987; Liu et al., 2013).

Neste sentido, em *Oxalis*, por exemplo, são registradas visitas de abelhas de diferentes famílias (ex: Andrenidae, Apidae, Halictidae e Megachilidae), o que pode indicar que muitos de seus sistemas sejam generalistas. O recurso floral disponível para os visitantes florais de

*Oxalis* comumente varia entre néctar e/ou pólen (Abreu et al., 2008), e estes recursos permitem um sistema misto majoritariamente formado por Lepidopteros e Hymenopteros. Além disso, as relações das combinações eficientes e ineficientes podem ter um papel importante na história evolutiva e na força da seleção fenotípica. Dessa forma, um sistema generalista pode apresentar um ajuste morfológico por seleção natural, se houver uma alta frequência de combinações eficientes. É entendido ainda, que cada grupo de polinizador pode exercer influências distintas na morfologia floral, permitindo, por exemplo, o surgimento de ajustes morfológicos ou também anulação entre as forças de seleção natural, provocadas por guildas de polinizadores distintos (Fenster et al., 2004; Benitez-Vieyra et al., 2009).

Plantas com diferentes polinizadores estão sujeitas a variações morfológicas mediada pela forma como estes tocam de maneiras distintas as estruturas reprodutivas (Nattero et al., 2010). Em alguns casos esses visitantes possuem variação na sua estrutura (tamanho do corpo, formato do aparato bucal e variação no tamanho das pernas) e no comportamento de visita, de forma que, há combinações eficientes e não eficientes (Cocucci et al., 2000). Assim, mesmo em um sistema especializado, pode haver uma variação na região do corpo do polinizador (parte ventral do corpo e na cabeça da abelha) que toca as regiões reprodutivas da flor, devido a uma enorme variedade de tipos de visitantes, além da variação na altura dos pistilos e localização do recurso nas flores (Simpson and Neff, 1981; Cocucci, 1991; Cocucci et al., 2000; Cosacov et al., 2008). Isso pode ajudar a entender as razões pelas quais sistemas generalistas, como o encontrado em *O. psoraleoides*, ainda mantém o funcionamento da tristilia e a ocorrência dos três morfos na população, mesmo diante do declínio de polinizadores especializados em um Bioma tão devastado como a Caatinga, região semi-árida do Nordeste do Brasil.

### **Agradecimentos**

Todos os autores desejam agradecer a Oswaldo Cruz Neto e Ana Carolina Galindo da Costa pela leitura prévia e sugestões, acerca da avaliação do projeto e primeira versão deste manuscrito. Agradecemos a Raffael Beltrão Silva e Arthur Domingos de Melo pela fabricação das imagens e esquemas ilustrativos do artigo. Nós também agradecemos ao Laboratório de Biologia Floral e Reprodutiva, pelo apoio e infraestrutura deste estudo. E por fim, agradecemos ao Programa de estudo de longa duração (PELD) pelo apoio na execução da pesquisa, através de fornecimento de alojamento e deslocamento dentro do Parque Nacional Vale do Catimbau/Buíque/Pernambuco.

### **Declaração de contribuição da autoria (CRediT)**

**Luciana Soares Lima:** coleta de dados, investigação e escrita-versão original; **Túlio Freitas Filgueira de Sá:** Metodologia, Software, validação, escrita-revisão e edição; **Sinzingando Albuquerque de Lima:** Metodologia, escrita-revisão e edição; **Arthur Domingos de Melo:** Metodologia, Software, validação, escrita-revisão e edição; **Isabel Cristina Machado:** Metodologia, escrita-revisão e edição, validação, recursos, supervisão.

#### **Declaração de interesse concorrente**

Os autores declaram que não tem conflito de interesse.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Concluimos que a tristilia em *Oxalis psoraleoides* favorece a polinização cruzada, por meio de um sistema misto de polinização por lepidópteros e abelhas. No entanto, o sucesso reprodutivo diferenciado e a quebra do sistema de incompatibilidade heteromórfica, observado pela produção de frutos entre estruturas de níveis diferentes (estames e pistilos) e entre morfos distintos, resultaram no desequilíbrio da proporção dos morfos. A menor convergência entre as estruturas florais (anteras e estigmas; e entre os dois níveis de estames na mesma flor), verificadas pela morfometria e os índices de reciprocidade, evidenciaram um baixo ajuste morfológico que influenciou a especificidade da relação planta-polinizador.

Deste modo, a proporção anisopleítica encontrada para *O. psoraleoides* pode significar tanto uma variação da alocação sexual materna, como também perda da alta precisão do contato pólen-estigma. Resultando, por conseguinte, na variação do fitness e eficiência reprodutiva dos morfos. Sendo assim, sugerimos que o sistema de polinização misto pode estar contribuindo para a presença de características atípicas na espécie. Descartamos a possibilidade de transição da tristilia para distilia, visto haver grande diferença no número de indivíduos do morfo mediostilo. Estudos com fluxo de pólen são necessários em populações de *O. psoraleoides* a fim de analisar se a diversidade de polinizadores e a mecânica da flor, através da hercogamia recíproca, geram fluxo polínico legítimo na espécie.

## REFERÊNCIAS

- Abid, R., Alam, J., Qaiser, M., 2010. Pollination mechanism and role of insects in *Abutilon indicon* (L.) Sweet. Pak. Journal Botany. 42, 1395-1399.
- Abreu, M.C., Carvalho, R., Sales, M.F., 2008. *Oxalis* L. (Oxalidaceae) no Estado de Pernambuco, Brasil. Acta Botanica. Brasilica. 22, 399-416.
- Allee, W.C., Emerson, A.E., Park, O., Park, T., Schmidt, K.P., 1949. Principles of animal ecology. W. B. Saunders Company, Philadelphia, PA, USA.
- Armbruster, W. S., Hansen, T.F., Pélabon, C., Pérez-Barrales, R., Maad, J., 2009. The adaptive accuracy of flowers: measurement and microevolutionary patterns. Annals of Botany. 103, 1529-1545.
- Armbruster, W.S., Bolstand, G.H., Hansen, T.F., Keller, B., Conti, E., Pélabon, C., 2017. The measure and mismeasure of reciprocity in heterostylous flowers. New Phytologist, 1-12.
- Arroyo, M. T. K., Humana, A. M., Domínguez, D., Jespersen, G., 2012. Incomplete trimorphic expression in *Oxalis compacta* Gill ex Hook. Et Arn. Subsp. Compacta in the Central Chilean Andes. Gayana Bot. 69, 88-99.
- Baena-Díaz, F., Fornoni, J., Sosenski, P., Molina-Freaner, F.E., Weller, S.G., Pérez-Ishiwara, R., Domínguez, C.A., 2012. Changes in reciprocal herkogamy during the tristily-distily transition in *Oxalis alpina* increase efficiency in pollen transfer. Journal of Evolutionary Biology. 25, 574-583.
- Barrett, S.C.H., 1989. The evolutionary breakdown of heterostyly, in: Bock, J.H., Linhart, Y.B.(Eds.), The evolutionary ecology of plants. Boulder: Westview Press, pp. 151-169.
- Barrett, S.C.H., Richards, J.H., 1990. Heterostyly in tropical plants. Memoirs of the New York Botanical Garden. 55, 35-61.
- Barrett, S.C.H., 1992. Evolution and function of heterostyly. Springer-Verlag, Berlin.
- Barrett, S.C.H., 1993. The evolutionary biology of tristily, in: Futuyma, D.J., Antonovics, J. (Eds.), Oxford surveys in evolutionary biology. Oxford University Press, Oxford, UK, pp. 283–326.
- Barrett, S.C.H., Jesson, L.K., Baker, A.M., 2000. The evolution and function of stylar polymorphisms in flowering plants. Annals of Botany. 85, 253-265.
- Barrett, S.C.H., 2010. Understanding plant reproductive diversity. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. 365, 99-109.
- Barrett, S.C.H., 2019. The evolutionary breakdown of heterostyly. The evolutionary ecology of plants. 151-169.
- Barrett, S.C.H., Richards, J.H., 1990. Heterostyly in tropical plants. Memoirs of the New York Botanical Garden. 55, 35-61.

- Barrett, S.C.H., Shore, J. S., 1987. Variation and evolution of breeding systems in the *Turnera ulmifolia* L. complex (TURNERACEAE). *Evolution*. 41, 340-354.
- Barrett, S. C. H., Shore, J. S., 2008. New insights on heterostyly: comparative biology, ecology and genetics, in: Franklin-Tong, V. E. (Eds.), *Self-Incompatibility in Flowering Plants: Evolution, Diversity, and Mechanisms*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 3–32.
- Benitez-Vieyra, S., Medina, A.M., Cocucci, A.A., 2009. Variable selection patterns on the labellum shape of *Geoblasta pennicillata*, a sexually deceptive orchid. *J. Evol. Biol.* 22, 2354–2362.
- Bir Bahadur, A., 1968. Heterostyly in Rubiaceae: a review. *Journal of Osmania University (Science)*. Golden Jubilee Volume, 207-238.
- Brys, R., Jacquemyn, H., Beeckman, T., 2008. Morph-ratio variation, population size and female reproductive success in distylous *Pulmonaria officinalis* (*Boraginaceae*). *Journal of Evolutionary Biology*. 21, 1281– 1289.
- Bullock, S. H., 1985. Breeding systems in the flora of a tropical deciduous forest in Mexico. *Biotropica*. 17, 287-301.
- Castro, S., Loureiro, J., Santos, C., Ater, M., Ayensa, G., Navarro, L., 2007. Distribution of flower morphs, ploidy level and sexual reproduction of the invasive weed *Oxalis pes-caprae* in the western area of the Mediterranean region. *Annals of Botany*. 99, 507– 517.
- Castro, S., Ferrero, V., Costa, J., Sousa, A.J., Navarro, L., Loureiro, J., 2013. Reproductive strategy of the invasive *Oxalis pes-caprae*: distribution patterns of flower morphs, ploidy levels and sexual reproduction. *Biol. Inv.* 15, 1863–1875.
- Cesaro, A. C., Thompson, J. D., 2004. Darwin's cross-promotion hypothesis and the evolution of stylar polymorphism. *Ecology letters*. 7 , 1209-1215.
- Costa, J., Ferrero, V., Loureiro, J., Castro, M., Navarro, L., Castro, S., 2012. Sexual reproduction of the pentaploid, short-styled *Oxalis pes-caprae* allows the production of viable offspring. *Plant Biology*, 208-214.
- Costa, J., Ferrero, V., Castro, M., Jorge, A., Afonso, A., Loureiro, J., Castro, S., 2016. Pollen flow between flowers of the same morph in invasive populations of *Oxalis pes-caprae* L. in the western Mediterranean region. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*. 150, 923-931.
- Colautti, R.I., White, N.A., Barrett, S.C.H., 2010. Variation in self-incompatibility within invasive populations of purple loosestrife (*Lythrum salicaria* L.) from eastern North America. *International Journal of Plant Sciences*. 171, 158– 166.
- Consolaro, H., Silva, S.C.S., Oliveira, P.E., 2011. Breakdown of distyly and pin-monomorphism in *Psychotria carthagenensis* Jacq. (Rubiaceae). *Plant Species Biology*. 26, 24–32.
- Cunha, N.L., Fischer, E., Lorenz-Lemke, A.P., Barrett, S.C.H., 2014. Floral variation and environmental heterogeneity in a tristylous clonal aquatic of the Pantanal wetlands of Brazil. *Ann Bot.* 114, 1637–1649.

- Charlesworth, D., Charlesworth, B., 1979. A model for the evolution of distyly. *The American Naturalist*. 114, 467-498.
- Chen, M.L., Liu, D.Y., Li, S., 2007. Observation of micromorphological characters of five species in *Oxalis*. *Journal of Plant Resources and Environment*. 16, 7-18.
- Cocucci, A., 1991. Pollination biology of *Nierembergia* (Solanaceae). *Plant Systematics and Evolution*. 174, 17-35.
- Cocucci, A. A., Sérsic, A., Roig-Alsina, A., 2000. Oil-collecting structures in Tapinotaspidini: Their diversity, function and probable origin. *Mitteilungen der Münchner Entomologischen Gesellschaft*. 90, 51-74.
- Cosacov, A., Nattero, J., Cocucci, A.A., 2008. Variation of pollinator assemblages and pollen limitation in a locally specialized system: the oil producing *Nierembergia linariifolia* (Solanaceae). *Ann. Bot.* 102, 723-734.
- Darwin, C., 1877. *The different forms of flowers on plants of the same species* (Cambridge Library Collection-Darwin, Evolution and Genetics). Cambridge University Press, Cambridge. doi:10.1017/CBO9780511731419
- Faegri, K., Van Der Pijl, L., 1976. *The principles of the pollination ecology*. Pergamon Press, Oxford.
- Faife-Cabrera, M., Ferrero, V., Navarro, L., 2014. Unravelling the stylar polymorphism in *Melochia* species (Malvaceae): Reciprocity and ancillary characters. *Bot J Linn Soc.* 176, 147-158.
- Ferrero, V., Castro, S., Sánchez, J.M., Navarro, L., 2011. Stigma-anther reciprocity, pollinators, and pollen transfer efficiency in populations of heterostylous species of *Lithodora* and *Glandora* (Boraginaceae). *Plant Syst Evol.* 291, 267-276.
- Ferrero, V., Barrett, S.C.H., Arroyo, J., Navarro, L., 2016. Associations between sex-organ deployment and morf. bias in related heterostylous taxa with different stylar polymorphisms. *American Journal of Botany*. 1, 1-12.
- Fenster, C.B., Armbruster, W.S., Wilson, P., Dudash, M.R., Thomson, J.T., 2004. Pollination syndromes and floral specialization. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 35, 375-403.
- Ganders, F.R., 1979. The biology of heterostyly. *New Zealand Journal of Botany*. 17, 607-635.
- Hodgins, K. A., Barrett, S. C., 2008. Geographic variation in floral morphology and style-morph ratios in a sexually polymorphic daffodil. *American Journal of Botany*. 95, 185-195.
- Heuch, I., 1980. Loss of incompatibility types in finite populations of the heterostylous plant *Lythrum salicaria*. *Hereditas*. 92, 53-57.
- Krug, C., Silva, C.I., Dos Santos, I.A., 2012. Interaction between bees and the tristylous flowers of *Oxalis cytisoides* Mart.& Zucc. (Oxalidaceae). *Psyche*. 1-8

- Ibama, 2002. Decreto, s/n, de 13 de dezembro de 2002. Dispõe sobre a criação do Parque Nacional do Catimbau, nos Municípios de Ibimirim, Tupanatinga e Buíque, no Estado de Pernambuco, e dá outras providências. Brasília.
- Jacquemyn, H. G., Marie, B. R., 2018. Is sexual organ reciprocity related to legitimate pollen deposition in distylous *Pulmonaria* (Boraginaceae)? *Oikos*. 127, 1216-1224.
- Lloyd, D. G., Webb, C. J., 1986. The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigmas in angiosperms I. Dichogamy. *New Zealand journal of botany*. 24, 135-162.
- Liu, W., Wang, Y., Chen, Q., Yu, S., 2013. Pollination of invasive *Eichhornia crassipes* (Pontederiaceae) by the introduced honeybee (*Apis mellifera* L.) in South China. *Plant Systematics and Evolution*. 299, 817-825.
- Lourteig, A., 1983. Oxalidáceas, in: R. Reitz (Eds.), *Flora Ilustrada Catarinense*, fascículo Oxal., Itajaí, Santa Catarina.
- Luo, S., Zhang, D., Renner, S. S., 2006. *Oxalis debilis* in China: distribution of flower morphs, sterile pollen and polyploidy. *Annals of Botany*. 98, 459-464.
- Marco, D. E., Arroyo, M. T. K., 1998. The breeding system of *Oxalis squamata*, a tristylous South American species. *Botanica Acta*. 111, 497-504.
- Muchhala, N., 2006. The pollination biology of *Burmeistera* (Campanulaceae): specialization and syndromes. *American Journal of Botany*. 93, 1081-1089.
- Muchhala, N., 2007. Adaptive trade-off in floral morphology mediates specialization for flowers pollinated by bats and hummingbirds. *The American Naturalist*. 169, 494-504.
- Nattero, J., Cocucci, A.A., Medel, R., 2010. Pollinator-mediated selection in a specialized pollination system: matches and mismatches across populations. *Journal of Evolutionary Biology*. 23, 1957-1968.
- Ollerton, J., Killick, A., Lamborn, E., Watts, S., Whiston, M., 2007. Multiple meanings and modes: on the many ways to be a generalist flower. *Taxon*. 56, 717-728.
- Ornduff, R., 1972. The breakdown of trimorphic compatibility in *Oxalis*, section *Corniculata*. *Evolution*. 26, 52-65.
- Pacheco, R. P. D., Coleman, J. R., 1989. Reproductive Morphology, Genetic-Control And Incompatibility Relations In Tristylous *Oxalis-Physocalyx* (Oxalidaceae). *Revista Brasileira de Genética*. 347-359.
- Paillet, T., Thompson, J. D., 1997. Distyly and variation in heteromorphic incompatibility in *Gaertnera vaginata* (RUBIACEAE) endemic to La Reunion Island. *American journal of botany*. 84, 315-327.
- Pérez-barrales, R., Arroyo, J., 2010. Pollinator shifts and the loss of style polymorphism in *Narcissus papyraceus* (AMARYLLIDACEAE). *Journal of Evolutionary Biology*. 23, 1117-1128.

- Santos-Gally, R., Pérez-Barrales, R., Simón, V. I., Arroyo, J., 2013. The role of short-tongued insects in floral variation across the range of a style-dimorphic plant. *Annals of Botany*. 111, 317-328.
- Simón-porcar, V. I., Santos-gally, R., Arroyo, J. 2014. Long-tongued insects promote disassortative pollen transfer in style-dimorphic *Narcissus papyraceus* (AMARYLLIDACEAE). *Journal of Ecology*. 102, 116-125.
- Simpson, B. B., Neff, J. L., 1981. Floral rewards: alternatives to pollen and nectar. *Annals of the Missouri botanical Garden*. 301-322.
- Sosenski, P., Fornoni, J., Molina-Freaner, F.E., Weller, S.G., Domínguez, C.A., 2010. Changes in sexual organ reciprocity and phenotypic floral integration during the tristily-distily transition in *Oxalis alpina*. *New Phytologist*. 185, 829-840.
- Sosenski, P., Fornoni, J., Domínguez, C. A., 2015. ¿ Es la disolución evolutiva de la tristilia un proceso frecuente? *Botanical Sciences*. 93, 419-428.
- Thompson, J.D., Paillet, T, Strasberg, D., Manicacci, D., 1996. Tristily in the endangered Mascarene Island endemic *Hugonia serrata* (LINACEAE). *American Journal of Botany*. 83, 1160–1167.
- Turketti, S.S., Esler, K.J., Dreyer, L.L., 2011. Three-dimensional reciprocity: A new form of tristily in South African *Oxalis* (OXALIDACEAE) species and its implications for reproduction. *South African Journal of Botany*. 78, 195-202.
- Webb, C.J., Lloyd, D.G., 1986. The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigmas in angiosperms II. Herkogamy. *New Zealand Journal of Botany*. 24, 163–178.
- Weber, J.J., Weller, S.G., Sakai, A.K., Nguyen, A., Tai, N.D., Domínguez, C.A., Molina-Freaner, F.E., 2012. Purging of inbreeding depression within a population of *Oxalis alpina* (Oxalidaceae). *American Journal of Botany*. 99, 923-932.
- Weber, J.J., Weller, S.G., Sakai, A.K., Tsyusko, O.V., Glenn, T.C., Domínguez, C.A., Molina-Freaner, F.E., Fornoni, J., Tran M., Nguyen N., Nguyen K., Tran L.K., Joice, G., Harding, E., 2013. The role of inbreeding depression and mating system in the evolution of heterostyly. *Evolution*. 67, 2309-2322.
- Weller, S.G., 1992. Evolutionary modifications of tristylous breeding systems, in: Barrett, S.C.H. (Eds.), *Evolution and function of heterostyly*. Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp. 247–270.
- Weller, S.G., Domínguez, C.A., Molina-Freaner, F.E., Fornoni, J., Lebuhn, G., 2007. The evolution of distily from tristily in populations of *Oxalis alpina* (Oxalidaceae) in the Sky Islands of the Sonoran Desert. *American Journal of Botan.*, 94, 972-985.
- Weller, S.G., Sakai, A.K., Gray, T., Weber, J.J., Tsyusko, O.V., Domínguez, J. F., Molina-Freaner, F. E., 2015. Variation in heterostylous breeding systems in neighboring populations of *Oxalis alpina* (Oxalidaceae). *Plant Biology*. 18, 104-110.

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

Weller, S. G., 1981. Pollination biology of heteromorphic populations of *Oxalis alpina* (Rose)(Oxalidaceae) in south-eastern Arizona. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 83, 189-198.

Wolfe, L.M., Barrett, S.C.H., 1987. Pollinator foraging behavior and pollen collection on the floral morphs of tristylous *Pontederia cordata* L. *Oecologia*, 74, 347–351.

Vogel, S., 2012. *Floral-biological syndromes as elements of diversity within tribes in the flora of South Africa*. Shaker Verlag, Germany.

Vuilleumier, B. S., 1967. The origin and evolutionary development of heterostyly in the angiosperms. *Evolution*. 21, 210-226.

**APÊNDICE A-TABELAS DO ARTIGO**

**Table 1** – Frequency of floral visitors of *Oxalis psoraleoides* Kunth. in Catimbau National Park, Pernambuco, identified by species or family.

| <b>Order</b>       | <b>Species/Family</b>        | <b>Number of recorded visits</b> | <b>Percentage of visits</b> |
|--------------------|------------------------------|----------------------------------|-----------------------------|
| Hymenoptera        | <i>Apis mellifera</i>        | 1672                             | 59.97%                      |
| Hymenoptera        | <i>Ceritina sp.</i>          | 572                              | 20.51%                      |
| Hymenoptera        | <i>Trigona spinipes</i>      | 542                              | 19.44%                      |
| Hymenoptera        | <i>Centris aenea</i>         | 2                                | 0.07%                       |
| <b>Hymenoptera</b> | <b>TOTAL</b>                 | <b>2788</b>                      | <b>43.13%</b>               |
| Lepidoptera        | <i>Pieridae</i>              | 1.487                            | 40.89%                      |
| Lepidoptera        | <i>Nymphalidae</i>           | 1.164                            | 32.01%                      |
| Lepidoptera        | <i>Hesperiidae</i>           | 505                              | 13.88%                      |
| Lepidoptera        | <i>Arctiidae</i>             | 250                              | 6.87%                       |
| Lepidoptera        | <i>Lycaenidae</i>            | 224                              | 6.16%                       |
| Lepidoptera        | <i>Papilionidae</i>          | 4                                | 1.10%                       |
| <b>Lepidoptera</b> | <b>TOTAL</b>                 | <b>3634</b>                      | <b>56.25%</b>               |
| <b>Diptera</b>     | Bombyliidae                  | <b>26</b>                        | <b>0.40%</b>                |
| <b>Apodiformes</b> | <i>Chlorostilbon lucidus</i> | <b>16</b>                        | <b>0.25%</b>                |
|                    | <b>GRAND TOTAL</b>           | <b>6464</b>                      | <b>100%</b>                 |

**Table 2** – Total frequency of *Oxalis psoraleoides* Kunth. floral visitors, by visiting hours in Catimbau National Park, Buíque, Pernambuco (Time 1: 6:00-8:00 a.m; time 2: 8:00-10:00 a.m; Time 3: 10:00-12:00 a.m; time 4: 12:00-15:00 a.m).

| <b>Visitors/Time</b>  | <b>1</b> | <b>2</b> | <b>3</b> | <b>4</b> | <b>TOTAL</b> |
|---|----------|----------|----------|----------|--------------|
| <b>Hymenoptera</b>  | 169      | 2.115    | 355      | 149      | <b>2.788</b> |
| <i>Apis mellifera</i>   | 162      | 1.332    | 178      | 0        | <b>1.672</b> |
| <i>Ceratina sp.</i>   | 3        | 254      | 166      | 149      | <b>572</b>   |
| <i>Trigona spinipes</i>   | 4        | 527      | 11       | 0        | <b>542</b>   |
| <i>Centris aenea</i>  | 0        | 2        | 0        | 0        | <b>2</b>     |
| <b>Lepidoptera</b>  | 76       | 778      | 2.525    | 219      | <b>3.634</b> |
| <i>Pieridae, Nymphalidae, Hesperiiidae, Lycaenidae and Papilionidae</i> | 7        | 609      | 2.156    | 211      | <b>2.983</b> |
| <i>Arctiidae</i>  | 69       | 169      | 3        | 9        | 220          |
| <b>Diptera</b>  | 16       | 10       | 0        | 0        | 26           |
| Bombyliidae   |          |          |          |          |              |
| <b>Apodiformes</b>  | 1        | 15       | 0        | 0        | 16           |

*Chlorostilbon lucidus*

---

|              |            |              |              |            |              |
|--------------|------------|--------------|--------------|------------|--------------|
| <b>TOTAL</b> | <b>262</b> | <b>2.955</b> | <b>2.879</b> | <b>368</b> | <b>6.464</b> |
|--------------|------------|--------------|--------------|------------|--------------|

---

|  |          |          |          |          |              |
|--|----------|----------|----------|----------|--------------|
|  | <b>1</b> | <b>2</b> | <b>3</b> | <b>4</b> | <b>TOTAL</b> |
|--|----------|----------|----------|----------|--------------|

---

**Table 3** – Mean and standard deviation of measurements (in mm) of stamens and pistils, for each floral morph of *Oxalis psoraleoides*.

| Morphs       | Stamen Height |               |            | Pistil Height |               |            |
|--------------|---------------|---------------|------------|---------------|---------------|------------|
|              | Stamen High   | Stamen Medium | Stamen Low | Pistil High   | Pistil Medium | Pistil Low |
| Short-styled | 5.13±0.57     | 3.27±0.49     | -----      | -----         | -----         | 1.89±0.39  |
| Mid-styled   | 5.28±0.75     |               | 2.46±0.47  |               | 3.69±0.68     |            |
| Long-styled  | -----<br>-    | 3.36±0.39     | 2.54±0.22  | 5.53±0.59     |               | -----      |

**Table 4** – Estimates of inaccuracy in *Oxalis psoraleoides* Kunth. (Oxalidaceae). The total inaccuracy is given by the sum of the inaccuracy values of the high, medium and low organs.

| <b>Reproductive morphs<br/>(anther x stigma<br/>reciprocity)</b> | <b>Reproductive<br/>organ</b> | <b>Inaccuracy<br/>(mm<sup>2</sup>)</b> | <b>Average inaccuracy per<br/>level (mm<sup>2</sup>)</b> | <b>Inaccuracy<br/>(%)</b> |
|--|-------------------------------|--|--|---------------------------|
| M-morph x L-morph  | High                          | 0,99                                   | 0,9  | 38,08                     |
| S-morph x L-morph  | High                          | 0,85                                   |  |                           |
| L-morph x M-morph  | Medium                        | 0,74                                   | 0,8  | 33,94                     |
| S-morph x M-morph  | Medium                        | 0,89                                   |  |                           |
| M-morph x S-morph  | Low                           | 0,71                                   | 0,7  | 27,98                     |
| L-morph x S-morph  | Low                           | 0,64                                   |  |                           |
| <b>Total inaccuracy</b>  | <b>2,409</b>                  |  |  |                           |

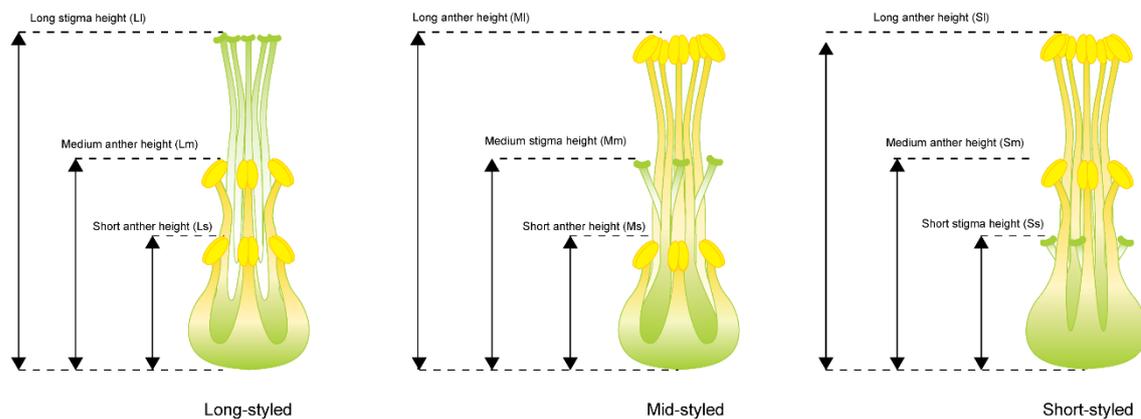
**Table 5** – Fruit set (%) after manual and natural pollination (Control) in *Oxalis psoraleoides*, only the control and intermorph cross-pollination treatments formed fruit, with no fruit formation in the intramorph, spontaneous self-pollination and manual self-pollination treatments. In intermorph cross-pollination, fruit formation occurred in both legitimate and illegitimate crosses. In the legitimate intermorph crossbreeding the production was higher in the mid-styled morph, followed by the long-styled and short-styled. Pollen donor: SA=Short anther, LA=Long anther, MA=Medium anther

| Morph               | Intramorph |          |             |                  |                       | Intermorph       |         |         |                                   |         |         |
|---------------------|------------|----------|-------------|------------------|-----------------------|------------------|---------|---------|-----------------------------------|---------|---------|
|                     | Intramorph | Control  | Spontaneous | Self-pollination | Two levels of anthers | Legitimate cross |         |         | Illegitimate cross (pollen donor) |         |         |
|                     |            |          |             |                  |                       | Short            | Medium  | Long    | MA                                | LA      | SA      |
| <b>Short-styled</b> | 0 (48)     | 0.39(48) | 0(48)       | 0(48)            | 0.4(24)               | -                | -       | -       | 0.2(12)                           | 0.2(12) | -       |
| <b>Mid-styled</b>   | 0(48)      | 0.73(48) | 0(48)       | 0(48)            | 0.8(24)               | -                | 0.4(12) | -       | -                                 | -       | 0.3(12) |
| <b>Long-styled</b>  | 0(48)      | 0.56(48) | 0(48)       | 0(48)            | 0.6(24)               | 0.2(12)          | -       | 0.2(12) | -                                 | -       | -       |

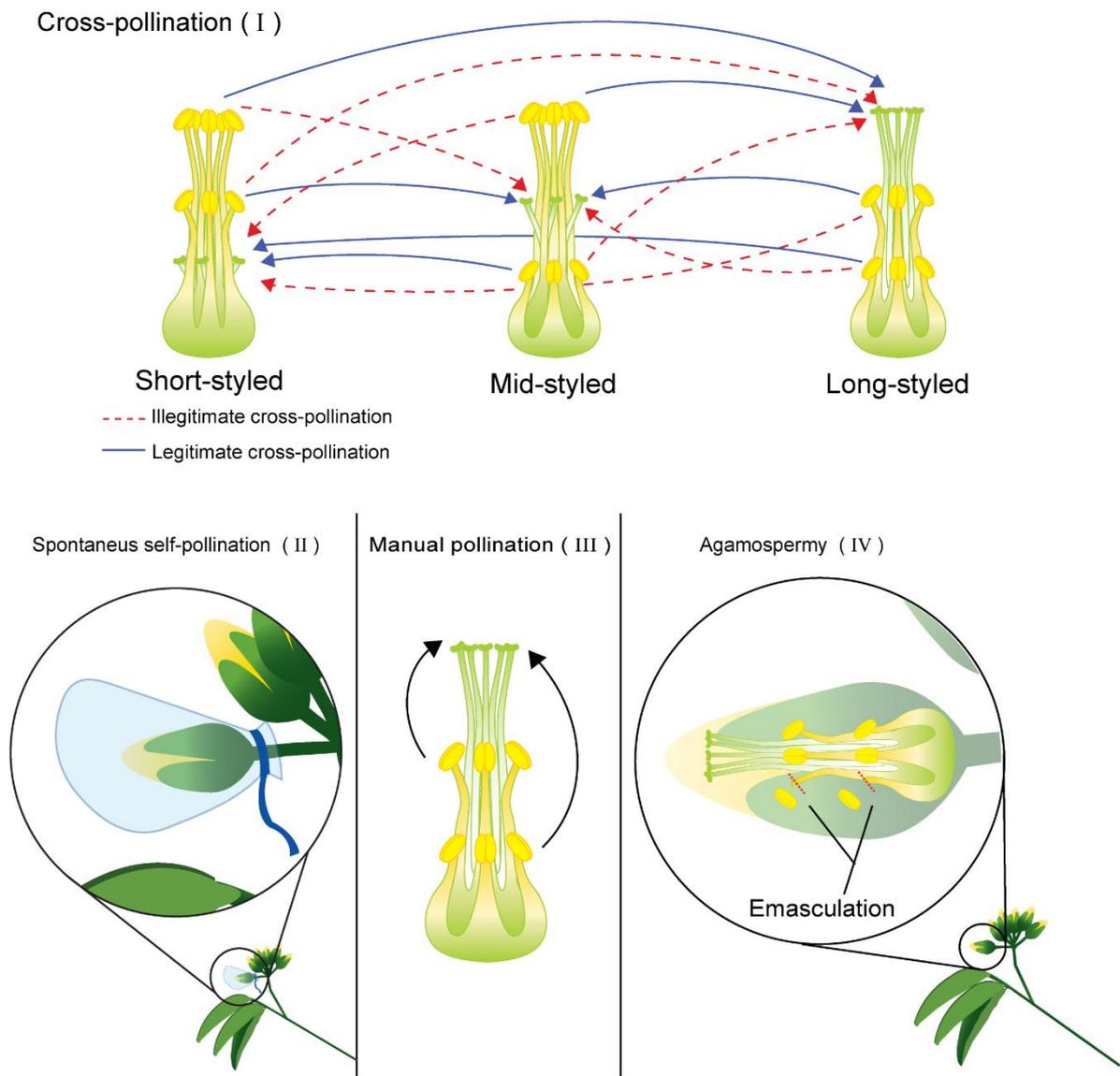
**Table 6** – Analysis of linear models (GLMs) to compare fruit set between treatments and fruit set between morphs and stamen levels in inter treatment. Values in bold indicate statistically significant differences. Fruit set differed between morphs and there was no interaction effect between the different treatments on fruit production. When analyzing fruit production in cross-pollination, there was only a difference in fruit production between morphs, regardless of the pollen donor anther level.

| Source of variation      | $\chi^2$ | d.f | P                |
|--------------------------|----------|-----|------------------|
| <b>All treatments</b>    |          |     |                  |
| Treatment                | 5.58     | 6   | 0.4              |
| Morph                    | 21.40    | 4   | <b>&lt;0.001</b> |
| <b>Cross pollination</b> |          |     |                  |
| Morph                    | 4.76     | 2   | <b>&lt;0.001</b> |
| Stamen level             | 0.72     | 2   | 0.69             |
| Morph x Stamen level     | 18.8     | 4   | <b>&lt;0.001</b> |

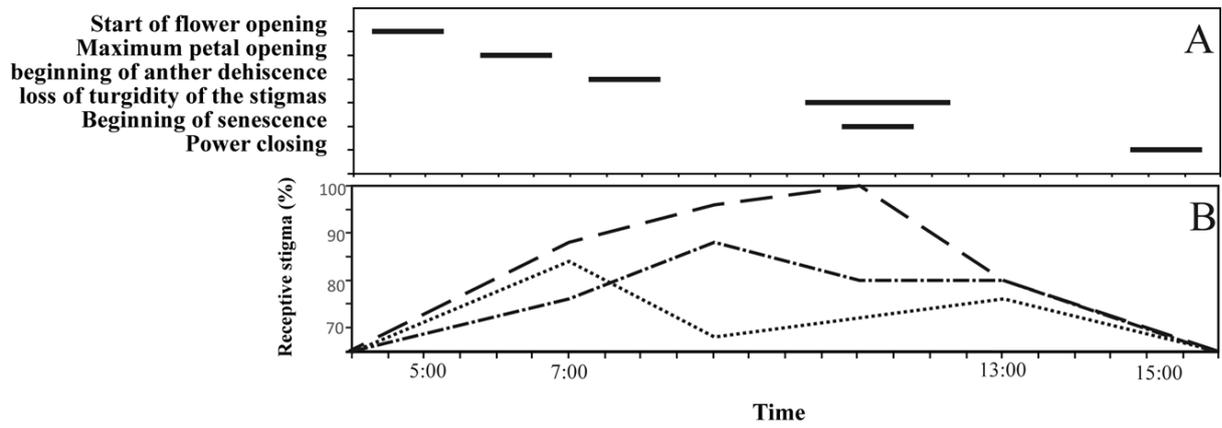
## APÊNDICE B-FIGURAS DO ARTIGO



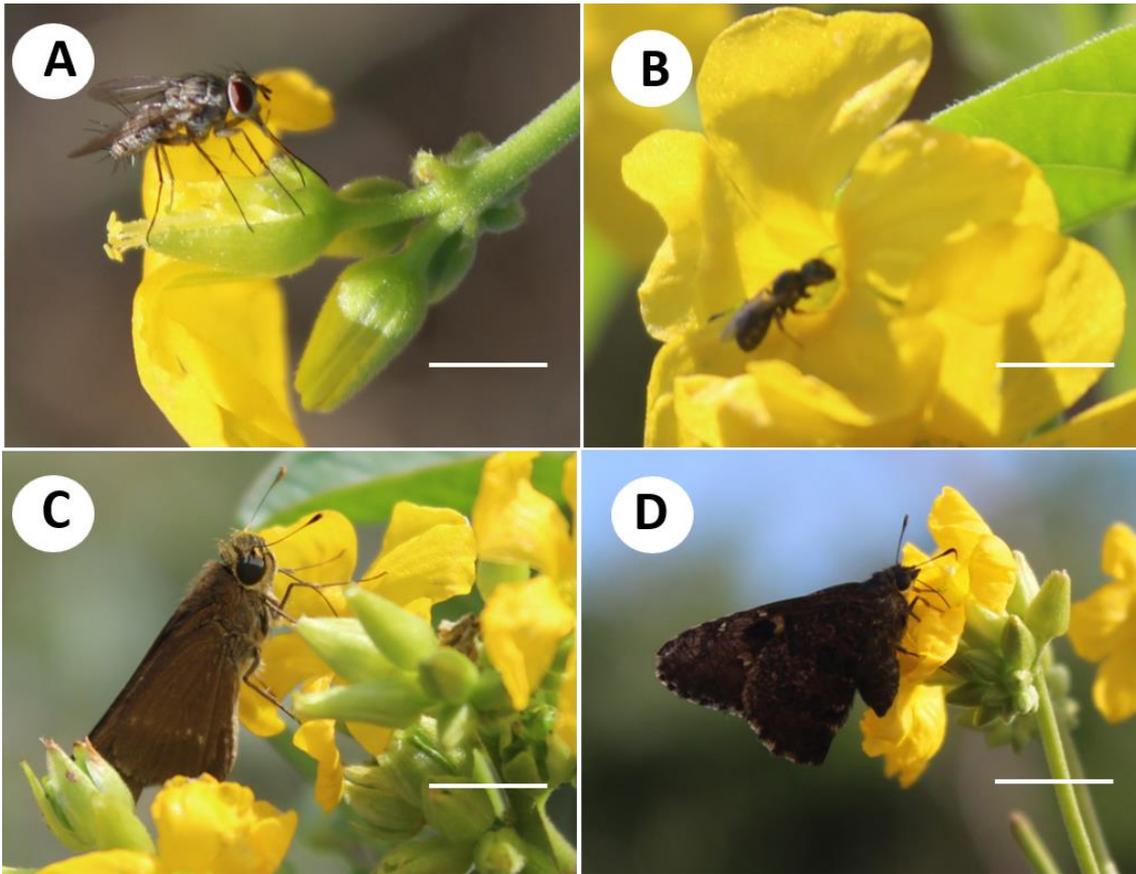
**Figure 1-** Representation of the analysis of the inaccuracy of low, medium and high organs of the reproductive structures of *Oxalis psoraleoides* Kunth. (Oxalidaceae) in the Catimbau National Park, Buíque, Pernambuco.



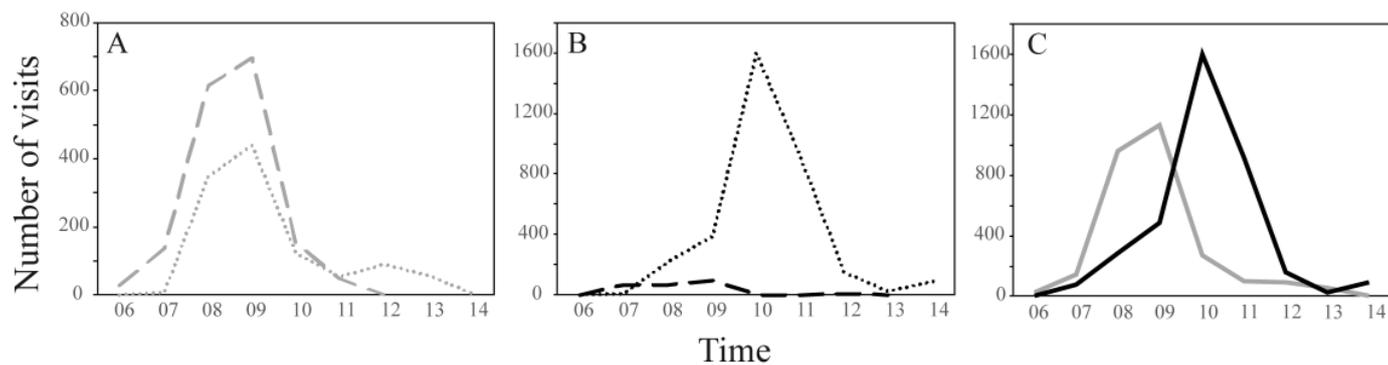
**Figure 2** – Pollination experiments performed on *Oxalis psoraleoides* Kunth.: I-Cross-pollination, in which the morphs receive pollen from another individual; the continuous blue arrows represent legitimate crossings (crossings between reproductive structures of different morphs and of the same height) and the dashed red arrows represent illegitimate crossings (crossings between the same morphs or between different morphs with reproductive structures of different heights); II-Spontaneous self-pollination, plants are bagged with a vole fabric to observe the development or not of fruits without contact with pollinators; III-Manual pollination, anthers of the flower itself are manually transferred to their stigmas, in the same flower and IV-Agamospermy, the stamens are removed from the flower (emasculatation) to observe possible fruit formation.



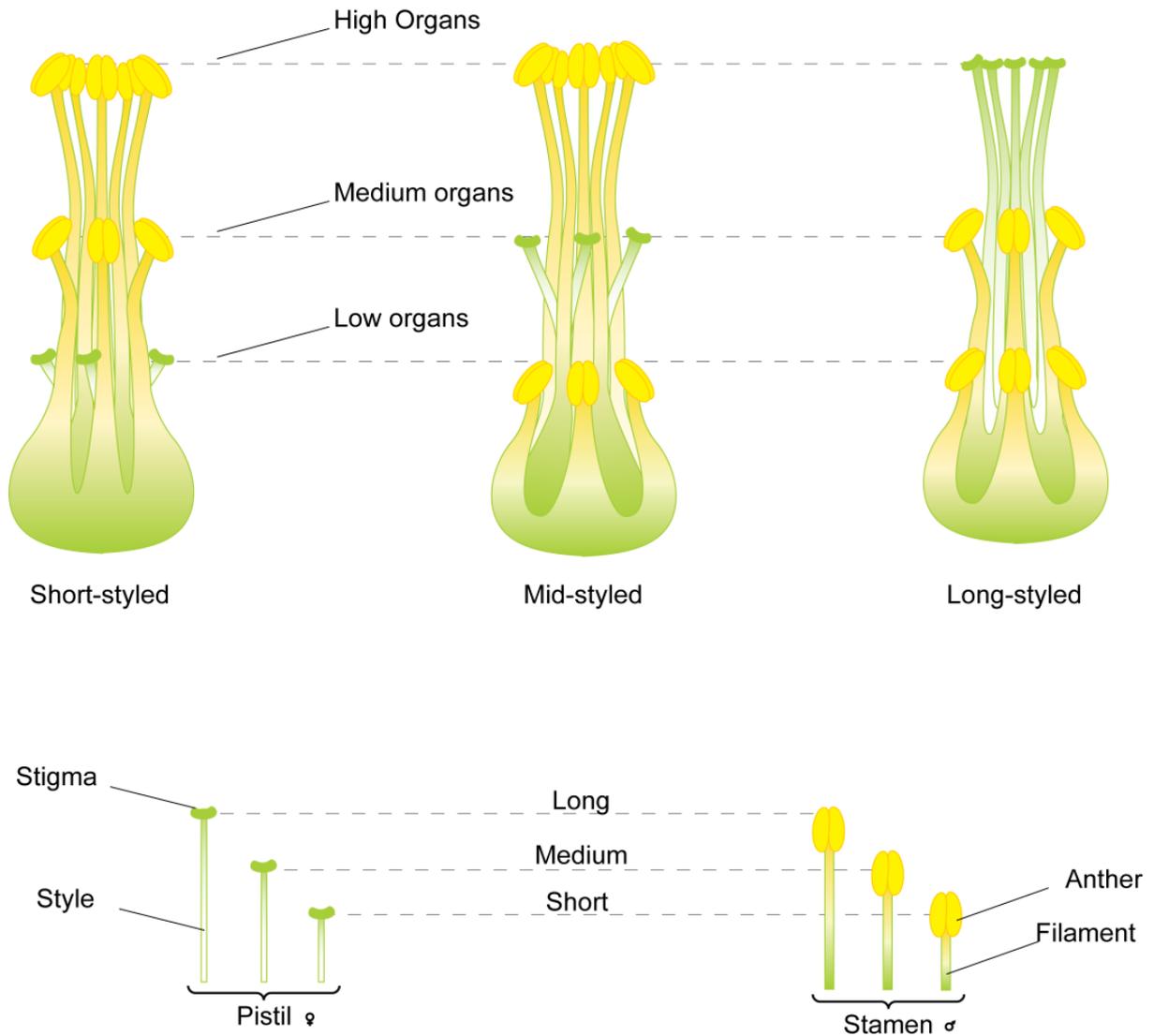
**Figure 3** – Sequence of anthesis of *Oxalis psoraleoides* in PARNA Catimbau, Pernambuco - Brazil. (A) Times of anthesis events and (B) proportion of receptive stigmas throughout anthesis in the different morphs. (Horizontal solid lines - anthesis events; dashed curve - Long-styled; dashed/dotted curve - Mid-styled; dotted curve - short-styled).



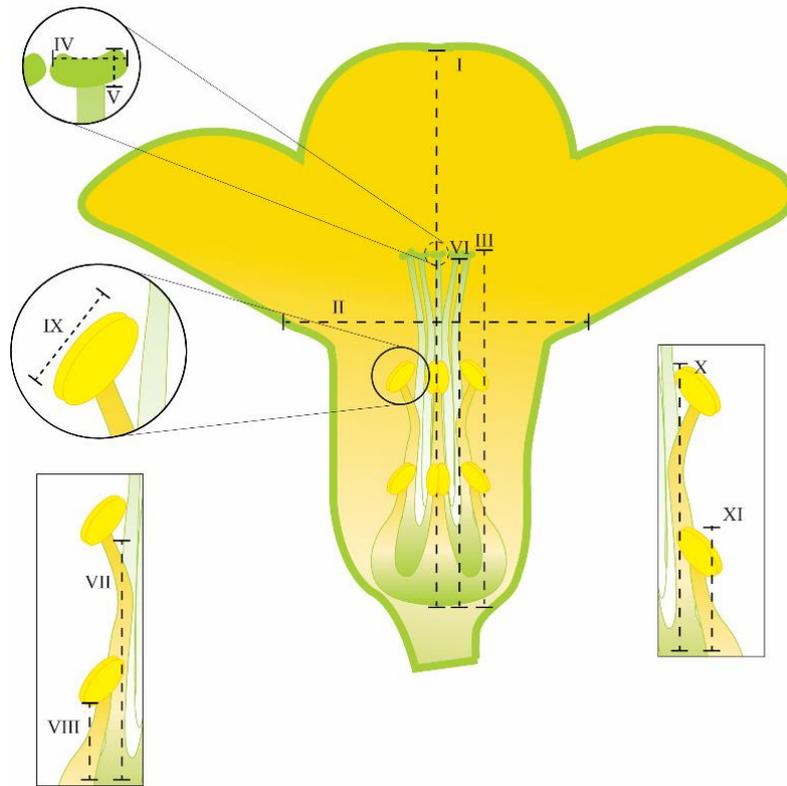
**Figure 4** – Floral visitors of *Oxalis psoraleoides* Kunth. in Catimbau National Park, Buíque, Pernambuco, Brazil: (A) Bombyliidae (Diptera) plundering nectar, through its long mouth apparatus in a flower of *O. psoraleoides*, where they stayed a long time in the flowers, however, the visits were infrequent; (B) *Ceratina* sp. collecting pollen from a long-styled morph of *O. psoraleoides* and contacting the reproductive structures, being considered pollinators (Apidae: Tribe *Xylocopini*); (C) and (D) *Hesperiidae* (Lepidoptera) landing on the corolla lobes and contacting the reproductive structures when collecting nectar, through their long proboscis, being considered pollinators. Scale 5 mm in the figures A, B, C and D.



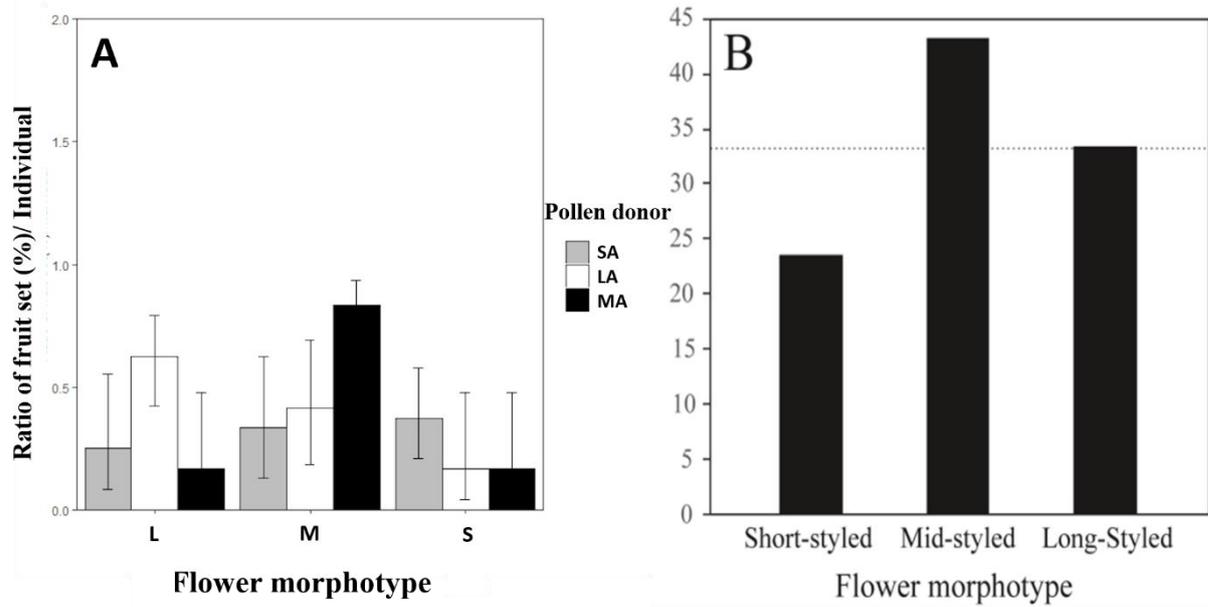
**Figure 5** – Frequency of floral visitors during anthesis of *Oxalis psoraleoides* Kunth. in Catimbau National Park, Buíque, Pernambuco - Brazil. (A) Visits by *Apis mellifera* and native bees (B) Visits by butterflies and moths and (C) Separation of visitation peaks between Hymenoptera and Lepidoptera. (dashed gray line - *Apis mellifera*; dotted gray line - native bees; dashed black line - moths; dotted black line - butterflies; solid gray line - Hymenoptera; solid black line - Lepidoptera).



**Figure 6** – Floral morphs of the tristylous *Oxalis psoraleoides* Kunth.: Short-styled, Mid-styled and Long-styled (from left to right), with two levels of anthers in the flower and stigmas in three heights (high, medium and low), resulting in the arrangement of high, medium and low organs in each of the morphs. Reproductive parts of morphs with tristyly: Pistil (female reproductive structure) composed of stigma, style; Stamens (male reproductive structure): anther, connective and filament.



**Figure 7** – Morphometric measurements made in *Oxalis psoraleoides* Kunth. flowers (here exemplified in the long-styled morph): I- Floral tube length; II- Floral apex width; III- Pistil length; IV- Stigma width; V- Stigma length; VI-Style length; VII- Filament length (medium anther); VIII- Filament length (short anther); IX-Anther size; X- Stamen length (medium anther) and XI- Stamen length (short anther).



**Figure 8** – A: Fruit set by cross-pollination of *Oxalis psoraleoides* Kunth. (Oxalidaceae) in Catimbau National Park, Buíque, Pernambuco. S: short-styled, M: Mid-styled and L: Long-styled; Pollen donor: SA=Short anther, LA=Long anther, MA=Medium anther. B: Fruit set by control treatment of *Oxalis psoraleoides* Kunth. (Oxalidaceae) in Catimbau National Park, Buíque, Pernambuco. S: Short-styled, M: Mid-styled and L: Long-styled.

## ANEXO C-REGRAS PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA FLORA

### GUIDE FOR AUTHORS

#### *Submission checklist*

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

#### **Ensure that the following items are present:**

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

*Manuscript:*

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

*Graphical Abstracts / Highlights files* (where applicable)

*Supplemental files* (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
  - All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
  - Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
  - A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
  - Journal policies detailed in this guide have been reviewed
  - Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements
- For further information, visit our [Support Center](#).

#### **BEFORE YOU BEGIN**

#### *Ethics in publishing*

Please see our information on [Ethics in publishing](#).

#### *Declaration of competing interest*

Corresponding authors, on behalf of all the authors of a submission, must disclose any financial

and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence

(bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies,

stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or

other funding. All authors, including those *without* competing interests to declare, should provide

the relevant information to the corresponding author (which, where relevant, may specify they have

nothing to declare). Corresponding authors should then use [this tool](#) to create a shared statement

and upload to the submission system at the Attach Files step. **Please do not convert the .docx**

**template to another file type. Author signatures are not required.**

#### *Submission declaration and verification*

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright holder.

To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [Crossref Similarity Check](#).

[Similarity Check](#).

#### AUTHOR INFORMATION

##### *Preprints*

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#).

Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information).

##### **Preprint posting on SSRN**

In support of [Open Science](#), this journal offers its authors a free preprint posting service. Preprints provide early registration and dissemination of your research, which facilitates early citations and collaboration.

During submission to Editorial Manager, you can choose to release your manuscript publicly as a preprint on the preprint server [SSRN](#) once it enters peer-review with the journal. Your choice will have no effect on the editorial process or outcome with the journal. Please note that the corresponding author is expected to seek approval from all co-authors before agreeing to release the manuscript publicly on SSRN.

You will be notified via email when your preprint is posted online and a Digital Object Identifier (DOI) is assigned. Your preprint will remain globally available free to read whether the journal accepts or rejects your manuscript.

For more information about posting to [SSRN](#), please consult the [SSRN Terms of Use](#) and [FAQs](#).

##### **Use of inclusive language**

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Content should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader; contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition; and use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias,

stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions. We advise to seek gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to avoid using "he, she," or "he/she." We recommend avoiding the use of descriptors that refer to personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition unless they are relevant and valid. When coding terminology is used, we recommend to avoid offensive or exclusionary terms such as "master", "slave", "blacklist" and "whitelist". We suggest using alternatives that are more appropriate and (self-) explanatory such as "primary", "secondary", "blocklist" and "allowlist". These guidelines are meant as a point of reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

### **Author contributions**

For transparency, we encourage authors to submit an author statement file outlining their individual contributions to the paper using the relevant CRediT roles: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review & editing. Authorship statements should be formatted with the names of authors first and CRediT role(s) following. [More details and an example.](#)

### **Changes to authorship**

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

### *Article transfer service*

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is

more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal.

[More information.](#)

### **Copyright**

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

### **Author rights**

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information.](#)

*Elsevier supports responsible sharing*

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

### **Role of the funding source**

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement, it is recommended to state this.

### **Open access**

Please visit our [Open Access page](#) for more information.

*Language (usage and editing services)*

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's Author Services.

## Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

### *Submit your article*

Please submit your article via <https://www.editorialmanager.com/flora/default.aspx>

*Submission of Papers with Graduate or Undergraduate Students as Lead Authors*  
FLORA has initiated a section in its journal dedicated to highlighting exceptional, original research publications that are part of PhD, graduate, or undergraduate student theses and carry the name of the student preferably as the lead author.

Papers in this category will be published under the heading "**Highlighted Student Research**" and will be marked accordingly in the table of content of the volume in which it is published.

The papers must be recommended for this honor by Handling Editors for FLORA, following the normal peer review process and taking additionally the following criteria into account: the student contribution to the work is substantial innovative research question or methodology high quality of study / experimental design and data above-average quality of data analysis, presentation and discussion well written text.

Students who wish their papers to be considered for the honor have to explain in the cover letter the main reasons why the paper represents an outstanding contribution to the field, referring to the criteria above, and indicate such wish by marking the appropriate box for the FLORA Highlighted Student Research paper during the online submission process. The supervisor should confirm in the cover letter that research was generated during a BSc, MSc, or PhD degree

### *Suggesting reviewers*

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential reviewers.

You should not suggest reviewers who are colleagues, or who have co-authored or collaborated with you during the last three years. Editors do not invite reviewers who have potential competing interests with the authors. Further, in order to provide a broad and balanced assessment of the work, and ensure scientific rigor, please suggest diverse candidate reviewers who are located in different countries/ regions from the author group. Also consider other diversity attributes e.g. gender, race and ethnicity, career stage, etc. Finally, you should not include existing members of the journal's editorial team, of whom the journal are already aware.

Note: the editor decides whether or not to invite your suggested reviewers.

## PREPARATION

### Queries

For questions about the editorial process (including the status of manuscripts under review) or for technical support on submissions, please visit our [Support Center](#).

### Peer review

This journal operates a single anonymized review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. Editors are not involved in decisions about papers which they have written themselves or have been written by family members or colleagues or which relate to products or services in which the editor has an interest. Any such submission is subject to all of the journal's usual procedures, with peer review handled independently of the relevant editor and their research groups. [More information on types of peer review](#).

### *Use of word processing software*

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor. Number pages and lines consecutively throughout the manuscript.

### Article structure

#### *Subdivision - numbered sections*

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

*Introduction*

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

*Material and methods*

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

*Theory/calculation*

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

*Results*

Results should be clear and concise.

*Discussion*

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

*Conclusions*

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

*Appendices*

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

**Essential title page information**

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about

Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

• **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

### **Highlights**

Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

### **Abstract**

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

#### *Graphical abstract*

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site. Authors can make use of Elsevier's [Illustration Services](#) to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

### **Keywords**

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using British spelling and avoiding

general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

#### *Abbreviations*

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

#### **Nomenclature and taxonomic reference**

If you have a small number of species (or vegetation units), please indicate full names and authorships

upon first appearance in the text, and skip authors thereafter. In case of a large number of species

names (or vegetation units), refer to a standard source for nomenclature such as a checklist or a flora.

References (in FLORA format) may be added following the keywords, see example below. Do not use

author citation for names in the text if they are given in the nomenclature source.

#### **Nomenclature:**

Stace (2010) for vascular plants; Hill et al. (2006) for mosses

#### *Acknowledgements*

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do

not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise.

List here those

individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance

or proof reading the article, etc.).

#### *Formatting of funding sources*

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy];

the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes

of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When

funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research

institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, it is recommended to include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or

not-for-profit sectors.

#### **Artwork**

##### *Electronic artwork*

##### *General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.

- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.
- Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

#### *Formats*

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then

please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is

finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution

requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

#### **Please do not:**

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

#### *Color artwork*

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or

MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit

usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear

in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations

are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive**

**information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please

indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of](#)

[electronic artwork.](#)

#### *Illustration services*

[Elsevier's Author Services](#) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but

concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

#### *Figure captions*

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure, and add them at the very end of the manuscript file. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

#### **Tables**

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

#### **References**

##### *Citation in text*

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication and a copy of the title page of the relevant article must be submitted.

##### *Web references*

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

##### *Data references*

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year,

and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

#### *References in a special issue*

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in

the text) to other articles in the same Special Issue.

#### *Reference management software*

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference

management software products. These include all products that support [Citation Style Language](#)

[styles](#), such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these products, authors only need to select

the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies

will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal,

please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use

reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting

the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference](#)

[management software](#).

#### *Reference style*

*Text:* All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of

publication;

2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;

3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references can be listed either first

alphabetically, then chronologically, or vice versa.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999)....

Or, as

demonstrated (Jones, 1999; Allan, 2000)... Kramer et al. (2010) have recently shown ...'

*List:* References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if

necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by

the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

#### *Examples:*

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci.*

*Commun.* 163, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2018. The art of writing a scientific article. *Heliyon*.

19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. Mendeley Data, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Reference to software:

Coon, E., Berndt, M., Jan, A., Svyatsky, D., Atchley, A., Kikinzon, E., Harp, D., Manzini, G., Shelef, E., Lipnikov, K., Garimella, R., Xu, C., Moulton, D., Karra, S., Painter, S., Jafarov, E., & Molins, S., 2020. Advanced Terrestrial Simulator (ATS) v0.88 (Version 0.88). Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3727209>.

*Journal abbreviations source*

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

### **Video**

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

### **Data visualization**

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

### **Supplementary material**

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

### **Research data**

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project. Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

#### *Data linking*

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#). For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

#### *Mendeley Data*

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading

your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley*

*Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

#### *Data in Brief*

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into

a data article published in *Data in Brief*. A data article is a new kind of article that ensures that your

data are actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and made publicly available

to all upon publication (watch this [video](#) describing the benefits of publishing your data in *Data in*

*Brief*). You are encouraged to submit your data article for *Data in Brief* as an additional item directly

alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article

will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed, published

open access and linked to your research article on ScienceDirect. Please note an [open access fee](#) is

payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the [Data in Brief website](#). Please

use [this template](#) to write your *Data in Brief* data article.

#### *MethodsX*

You have the option of converting relevant protocols and methods into one or multiple *MethodsX*

articles, a new kind of article that describes the details of customized research methods. Many

researchers spend a significant amount of time on developing methods to fit their specific needs or

setting, but often without getting credit for this part of their work. *MethodsX*, an open access journal,

now publishes this information in order to make it searchable, peer reviewed, citable and reproducible.

Authors are encouraged to submit their *MethodsX* article as an additional item directly alongside the

revised version of their manuscript. If your research article is accepted, your methods article will

automatically be transferred over to *MethodsX* where it will be editorially reviewed. Please note an

open access fee is payable for publication in *MethodsX*. Full details can be found on the [MethodsX](#)

[website](#). Please use [this template](#) to prepare your *MethodsX* article.

*Data statement*

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission.

This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

The journal *FLORA* requires authors to deposit the data associated with accepted papers in a public archive. For gene sequence data and phylogenetic trees, deposition in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) or TreeBASE (<http://www.treebase.org>), respectively, is required. There are many possible archives that may suit a particular data set, including the Dryad repository for ecological and evolutionary biology data (<http://datadryad.org>). All accession numbers for GenBank, TreeBASE, and Dryad must be included in accepted manuscripts before they go to Production.

**AFTER ACCEPTANCE****Online proof correction**

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

**Offprints**

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free

access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Author Services](#). Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

### **AUTHOR INQUIRIES**

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch. You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).