



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA

HETEROSTILIA E ESPECIALIZAÇÃO SEXUAL EM ESPÉCIES DE *Erythroxylum*
P. BROWNE (ERYTHROXYLACEAE) NO CERRADO DO BRASIL CENTRAL

RAPHAEL MATIAS DA SILVA

ORIENTADOR: HÉLDER NAGAI CONSOLARO

BRASÍLIA - DF
AGOSTO DE 2018



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA

HETEROSTILIA E ESPECIALIZAÇÃO SEXUAL EM ESPÉCIES DE *Erythroxylum*
P. BROWNE (ERYTHROXYLACEAE) NO CERRADO DO BRASIL CENTRAL

RAPHAEL MATIAS DA SILVA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade de Brasília, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Botânica.

ORIENTADOR: HÉLDER NAGAI CONSOLARO

BRASÍLIA - DF
AGOSTO DE 2018

RAPHAEL MATIAS DA SILVA

**HETEROSTILIA E ESPECIALIZAÇÃO SEXUAL EM ESPÉCIES DE *Erythroxylum*
P. BROWNE (ERYTHROXYLACEAE) NO CERRADO DO BRASIL CENTRAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade de Brasília, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Botânica.

Aprovada em 17 de agosto de 2018.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Marcelo Fragomeni Simon
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Membro titular

Prof. Dr. Paulo Eugênio A. M. de Oliveira
Universidade Federal de Uberlândia - UFU
Membro titular

Prof. Dr. Vinícius L. G. de Brito
Universidade Federal de Uberlândia - UFU
Membro titular

Prof. Dr. Hélder Nagai Consolaro
Universidade Federal de Goiás - UFG
Orientador

Prof^a. Dr^a. Cássia Beatriz Munhoz
Universidade de Brasília - UnB
Suplente

BRASÍLIA - DF

AGOSTO DE 2018

Dedico este trabalho aos meus pais e avós...

...motivos das minhas conquistas.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço aos meus pais (Valdirene e Junior), irmãos, avós, tios e a toda minha família que me apoiaram durante toda esta jornada acadêmica. Novamente, eu não conseguiria sem vocês!

Meus sinceros agradecimentos ao Prof. Dr. Hélder Nagai Consolaro, por ter aceitado me orientar durante a graduação, o mestrado e o doutorado. Agradeço pelos valiosos ensinamentos e pela confiança que tem depositado no meu trabalho durante todo esse tempo. Obrigado por toda ajuda e amizade.

A Profa. Dra. Rocio Perez Barrales, por ter acreditado e feito parte deste trabalho. Você foi essencial em todas as etapas da tese, assim como para meu amadurecimento profissional.

Aos integrantes do laboratório de Biologia Reprodutiva, Marco Túlio Furtado, Túlio Freitas Filgueira de Sá, Ebenézer Barbosa Rodrigues, Joicelene Regina Lima da Paz, Joicy Martins Morais, Paola Pisetta Raupp, Josiana Gonçalves Ribeiro, Jessyca Santana dos Santos e Matheus Rezende. Obrigado por todas sugestões, questionamentos, auxílio em campo, entre outras atividades desenvolvidas durante todo esse tempo.

A minha namorada Sílvia por todo companheirismo, compreensão, encorajamento, conversas, carinho e amor. Obrigado também por ter colocado a “mão na massa” e ter ajudado em muitos pontos da tese. Sua companhia e ajuda foi essencial! Não poderia também deixar de agradecer à família da Sílvia, pelo carinho e ajuda.

Agradeço aos amigos e membros da eterna república “BotEco”, Maxmiller Ferreira, Gustavo Mariano Rezende, Arthur de Paula Sousa, Marco Túlio Furtado, Daniel Chaves e aos membros da república “Tapera do Lago”, Letícia Gomes, Monique Alves, Ingrid, Dani, Marina, Bárbara e Rafael por sempre terem me acolhido em Brasília.

Ao Daniel Chaves, pela estadia e auxílio em campo em Diamantina, Minas Gerais.

À Lívia, pelo carinho, incentivo e por ter estado em meu lado no início do doutorado.

Ao Prof. Dr. Antônio José Camillo de Aguiar (UnB) por auxiliar na identificação das abelhas.

Ao Dr. Eduardo Barbosa (Pós-doc do PPGBOT-UnB) por sanar as dúvidas estatísticas que sempre surgiram.

Agradeço ao Prof. Dr. Paulo Eugênio A. M. de Oliveira e a Universidade Federal de Uberlândia por disponibilizar os equipamentos nas análises dos tubos polínicos.

Aos Profs. Drs. Felipe W. Amorim (Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”), Diana Salles Sampaio (Universidade Federal de Uberlândia), Rocio Perez Barrales (University of Portsmouth) e Christiano Peres Coelho (Universidade Federal de Goiás - Regional Jataí) pela ajuda durante as visitas técnicas.

Aos Profs. Drs. Mario Vallejo Marin, Luísa Mafalda Gigante Rodrigues Carvalheiro, Carolyn Elinore Barnes Proença e Vinícius L. G. de Brito por terem dado valiosas sugestões em meu projeto e qualificação.

Aos Profs. Drs. Marcelo Fragomeni Simon, Paulo Eugênio A. M. de Oliveira e Vinícius L. G. de Brito por participar da defesa final. Agradeço por todas as sugestões e ensinamentos.

A Profa. Dra. Cássia Beatriz Munhoz, coordenadora do PPGBOT, pela eficiência e prestatividade que foram tão importantes em diversos momentos do doutorado.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Botânica da UnB, funcionários e amigos que de alguma forma contribuíram com o desenvolvimento deste trabalho.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de estudo. Agradeço também ao Decanato de Pós-Graduação da UnB pelo auxílio à pesquisa e a FAPDF (Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal) pelos auxílios de visita técnica.

SUMÁRIO

Folha de rosto	ii
Página de aprovação	iii
Dedicatória	iv
Agradecimentos	v
Sumário	vii
Lista de Figuras	viii
Lista de Tabelas	xi
Resumo	xiv
Abstract	xv
Introdução Geral	1
Capítulo 1: Morphological inaccuracy in distylous <i>Erythroxyllum</i> (Erythroxyllaceae): comparisons between populations and species	15
Capítulo 2: Esterilidade masculina e sucesso reprodutivo feminino em espécies distílicas de <i>Erythroxyllum</i> (Erythroxyllaceae): variações espaciais e temporais	47
Capítulo 3: Especialização sexual está relacionada com compensação reprodutiva? uma investigação com espécies distílicas de <i>Erythroxyllum</i> (Erythroxyllaceae)	80
Considerações finais	110

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1: Morphological inaccuracy in distylous *Erythroxyllum* (Erythroxyllaceae): comparisons between populations and species.

- Figure 1.** Flowers of *Erythroxyllum* studied in the Cerrado of Central Brazil, showing L- and S-morph of *E. campestre* (A, B), *E. deciduum* (C, D), *E. suberosum* (E, F) and *E. tortuosum* (G, H) 38
- Figure 2.** Schematic representation of the relative position of stigmas and anthers in S- and L-flowers of *Erythroxyllum* species studied and the flower traits measured. Letters in parentheses correspond to the initials used for each type of organ in the analysis of reciprocity. For clarity, only four of 10 stamens per flower are drawn (two per whorl) 38
- Figure 3.** Geographic distribution and variation in morph ratio in populations of four *Erythroxyllum* species studied in 11 Cerrado areas of Central Brazil. Black and gray segments indicate the proportions of the L- and S-morph, respectively. Numbers correspond to the code of each area: 1 - Parque Nacional; 2 - APA do Paranoá; 3 - RECOR; 4 - Pasto do Pedrinho; 5 - Fazenda Pé do Morro; 6 - Pires Belo; 7 - PESCAN; 8 - Clube Caça & Pesca Itororó; 9 - Estação Ecológica do Panga; 10 - Ribeirão dos Infernos; 11 - Pedra da Baleia 39
- Figure 4.** Variation in anthers (♦: S-morph anthers and lower L-morph anthers; ▲: upper L-morph anthers) and stigmas height (○) in flowers of different populations of *Erythroxyllum campestre* and *E. deciduum* in the Cerrado of Central Brazil. Flowers are arranged in order of increasing stigmas height to illustrate the reciprocity between corresponding sexual organs. Sampled area of each population are showed in parenthesis 40
- Figure 5.** Variation in anthers (♦: S-morph anthers and lower L-morph anthers; ▲: upper L-morph anthers) and stigmas height (○) in flowers of different populations of *Erythroxyllum suberosum* and *E. tortuosum* in the Cerrado of Central Brazil. Flowers are arranged in order of increasing stigmas height to illustrate the reciprocity between corresponding sexual organs. Sampled area of each population are showed in parenthesis 41

Capítulo 2: Esterilidade masculina e sucesso reprodutivo feminino em espécies distílicas de *Erythroxyllum* (Erythroxyllaceae): variações espaciais e temporais.

- Figura 1.** Distribuição geográfica das populações das quatro espécies de *Erythroxyllum* (Erythroxyllaceae) analisadas em 10 áreas de Cerrado do Brasil Central. O sucesso reprodutivo feminino foi avaliado somente nas populações com pontos pretos, enquanto que a esterilidade masculina foi estudada em todas as populações (pontos pretos e brancos). Nome das áreas: 1 - Parque Nacional; 2 - APA do Paranoá; 3 - RECOR; 4 - Pasto do Pedrinho; 5 - Fazenda Pé do Morro; 6 - Pires Belo; 7 - PESCAN; 8 - Clube Caça & Pesca Itororó; 9 - Estação Ecológica do Panga; 10 - Pedra da Baleia 69
- Figura 2.** Comparações da viabilidade dos grãos de pólen entre flores brevistilas (barras pretas) e longistilas (barras cinzas) em diferentes populações de quatro

espécies de *Erythroxylum*. Os locais de coleta de cada população são mostrados na Figura 1. Os resultados são mostrados em média e erro padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre populações de uma mesma espécie ($P < 0.05$). Os asteriscos referem-se a diferenças estatisticamente significativas entre morfos dentro das populações ou em nível geral, considerando o conjunto de dados de todas as populações (** $P < 0.01$; * $P < 0.05$). 70

Figura 3. Comparações da viabilidade dos grãos de pólen entre flores brevistilas (barras pretas) e longistilas (barras cinzas) em diferentes anos de coleta dentro de uma mesma população para quatro espécies de *Erythroxylum*. As populações estudadas são as da área 5 (ver Figura 1 para localização da área). Os resultados são mostrados em média e erro padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os anos de coleta de uma mesma espécie ($P < 0.05$). Os asteriscos referem-se a diferenças estatisticamente significativas entre morfos dentro de cada ano ou em nível geral, considerando o conjunto de dados de todos os anos (** $P < 0.01$; * $P < 0.05$) 71

Figura 4. Comparações do sucesso reprodutivo entre indivíduos brevistilos (barras pretas) e longistilos (barras cinzas) em diferentes populações de quatro espécies de *Erythroxylum*. Os locais de coleta de cada população são mostrados na Figura 1. Os resultados são mostrados em média e erro padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre populações de uma mesma espécie ($P < 0.05$). Os asteriscos referem-se a diferenças estatisticamente significativas entre morfos dentro das populações ou em nível geral, considerando o conjunto de dados de todas as populações (** $P < 0.01$; * $P < 0.05$) 72

Figura 5. Comparações do sucesso reprodutivo entre indivíduos brevistilos (barras pretas) e longistilos (barras cinzas) em diferentes anos de coleta dentro de uma mesma população para quatro espécies de *Erythroxylum*. As populações estudadas são as da área 5 (ver Figura 1 para localização da área). Os resultados são mostrados em média e erro padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os anos de coleta de uma mesma espécie ($P < 0.05$). Os asteriscos referem-se a diferenças estatisticamente significativas entre morfos dentro de cada ano ou em nível geral, considerando o conjunto de dados de todos os anos (** $P < 0.01$; * $P < 0.05$) 73

Figura 6. Crescimento dos tubos polínicos em pistilos polinizados manualmente em quatro espécies de *Erythroxylum*. As populações estudadas são as da área 5 (ver Figura 1 para localização da área). *Erythroxylum campestre*: tubos polínicos chegando no final do estilete de flor brevistila (a) e longistila (b) após autopolinização. *Erythroxylum deciduum*: inibição dos tubos polínicos nos estigmas de flor brevistila (c) e longistila (d) após autopolinização. *Erythroxylum suberosum*: inibição dos tubos polínicos no estigma de flor brevistila (e) e no estilete de flor longistila (f) após autopolinização. *Erythroxylum tortuosum*: inibição dos tubos polínicos nos estigmas de flor brevistila após autopolinização (g) e nos estiletos de flor longistila após polinização cruzada intramorfo (h) 74

Figura S1. Comparações da viabilidade dos grãos de pólen entre anteras mais altas e mais baixas em flores longistilas de quatro espécies de *Erythroxylum* utilizando teste t para amostras pareadas. Não houve diferença significativa em nenhuma das quatro comparações ($P > 0.05$). Os números de flores utilizadas no experimento estão entre parênteses. Os dados são referentes às populações da área 5 (ver Figura 1 para localização da área) e foram transformados em logit (logaritmo para

transformação de dados proporcionais) quando não atingiram normalidade. Os resultados são mostrados em média e erro padrão 75

Capítulo 3: Especialização sexual está relacionada com compensação reprodutiva? uma investigação com espécies distílicas de *Erythroxylum* (Erythroxylaceae).

Figura 1. Fenologia de floração e frutificação em plantas brevistilas e longistilas de quatro espécies de *Erythroxylum* durante o período de maio de 2016 a abril de 2017 em uma área de Cerrado no Brasil Central 101

Figura 2. Frequência de visitação (número de visitas em intervalos de 30 minutos) em plantas brevistilas e longistilas de quatro espécies de *Erythroxylum* em uma área de Cerrado do Brasil Central. Os resultados são mostrados em média e erro padrão. O número de indivíduos e intervalos de tempo amostrados estão entre parênteses. *Erythroxylum deciduum* foi a única espécie que apresentou variação na taxa de visitação entre os morfos florais ($Z = 2.366$; d.f. = 1; $P = 0.018$) 102

Figura 3. Porcentagem de visitas realizadas por diferentes grupos de visitantes florais em indivíduos de quatro espécies distílicas de *Erythroxylum* em uma área de Cerrado no Brasil Central. O número de espécies de cada grupo de visitante também é mostrado acima de cada barra 103

Figura 4. Algumas abelhas e vespas visitantes florais de quatro espécies de *Erythroxylum* em uma área de Cerrado no Brasil Central. **A:** Flor longistila de *E. campestre* visitada por espécie de Megachilidae. **B:** Flor brevistila de *E. deciduum* visitada por *Augochloropsis* cf. *smithiana* (Halictidae). **C:** Flor longistila de *E. suberosum* visitada por *Pepsis* sp. (Pompilidae). **D:** Flor brevistila de *E. tortuosum* visitada por *Paratrigona lineata* (Apidae) 104

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1: Morphological inaccuracy in distylous *Erythroxyllum* (Erythroxyllaceae): comparisons between populations and species.

- Table 1.** Morph ratio and chi-square test to identify departure from isoplethy (1:1) in populations of four *Erythroxyllum* species in the Cerrado of Central Brazil 42
- Table 2.** Flower morphometrics of four *Erythroxyllum* species: sample size for the two floral morphs, mean (\pm variance) of the height of each organ type, average organ height across all organ types, mean (\pm variance) of upper and lower anthers in the L-morph, and mean (\pm standard deviation) of anther-stigma separation (using the upper anther in the case of L-flowers) in the two floral morphs. The morphometrics values are expressed in millimeters 43
- Table 3.** Results of the analysis of variance for the comparisons between floral morphs and populations of stigma height, anther height and herkogamy for the *Erythroxyllum* species studied. High anther height corresponds to the comparison between S-morph anthers and upper L-morph anthers. Low anther height corresponds to the comparison between S-morph anthers and lower L-morph anthers 44
- Table 4.** Estimates of inaccuracy of reciprocity in species and populations of *Erythroxyllum* in the Cerrado of Central Brazil (standardized inaccuracy in parentheses). The values of inaccuracy were standardized by the average² height of all organ types of the population. Total inaccuracy for each population (column 4) is the sum of the inaccuracy values of high and low organs (columns 2 and 3). In columns 5 and 6 are shown inaccuracy (absolute value in units of millimeters² and percentage standardized) of the low organs (S-stigmas and L-anthers) considering separately the upper (aA) and lower (aa) L-morph anthers 45
- Table 5.** Mean \pm standard deviation of pollen size and pollen production per anther in S- and L-flower of the *Erythroxyllum* species studied in the Cerrado of Central Brazil, including the results of the analysis of variance to identify differences among anthers types. Number of pollen grains measured, and flowers used to analyze pollen production are in parentheses. The values with different superscript letters were significantly different from each other at the 0.05 level in post-hoc tests 46
- Appendix S1.** Locations of the areas under study. DF= Federal District; GO= Goiás; MG= Minas Gerais 46

Capítulo 2: Esterilidade masculina e sucesso reprodutivo feminino em espécies distílicas de *Erythroxyllum* (Erythroxyllaceae): variações espaciais e temporais.

Tabela 1. Resultados das análises dos modelos lineares (GLMs para sucesso reprodutivo feminino e GLMMs para esterilidade masculina) averiguando variações temporais e espaciais na esterilidade masculina e no sucesso reprodutivo feminino de quatro espécies de *Erythroxyllum*. As comparações entre populações de uma mesma espécie foram feitas utilizando dados coletados no mesmo ano, e comparações entre anos de coleta foram realizadas com dados de apenas uma

população de cada espécie (ver Material e Métodos para mais detalhes). Os valores em negrito representam diferenças estatisticamente significativas	76
Tabela 2. Proporção de frutos formados em indivíduos brevistilos e longistilos após tratamentos de polinização manual e índices de autoincompatibilidade (ISI) em quatro espécies de <i>Erythroxylum</i> (ver Material e Métodos para mais detalhes). As populações estudadas são as da área 5 (ver Figura 1 para localização da área). O número de indivíduos utilizados nos tratamentos está entre parênteses. Os tratamentos dentro da mesma espécie que possuem diferentes letras sobrescritas foram diferentes significativamente entre si no nível de 0.05 em testes post-hoc. Não existem diferenças significativas entre os morfos dentro de cada tratamento	77
Tabela 3. Resultados das análises dos modelos lineares (GLMs para sistema de acasalamento e GLMMs para limitação polínica) comparando a produção de frutos após diferentes tratamentos de polinização com intuito de investigar o sistema de acasalamento e a limitação polínica (ver Material e Métodos para mais detalhes) em quatro espécies de <i>Erythroxylum</i> . As populações estudadas são as da área 5 (ver Figura 1 para localização da área). Os valores em negrito representam diferenças estatisticamente significativas	78
Tabela 4. Proporção de frutos formados em indivíduos brevistilos e longistilos de quatro espécies de <i>Erythroxylum</i> após tratamentos de polinização em flores abertas para investigar a ocorrência de limitação polínica (ver Material e Métodos para mais detalhes). As populações estudadas são as da área 5 (ver Figura 1 para localização da área). O número de indivíduos utilizados nos tratamentos está entre parênteses ..	78
Tabela S1. Localização das áreas investigadas neste estudo. DF= Distrito Federal; GO= Goiás; MG= Minas Gerais	79

Capítulo 3: Especialização sexual está relacionada com compensação reprodutiva? uma investigação com espécies distílicas de *Erythroxylum* (Erythroxylaceae).

Tabela 1. Valores médios (\pm desvio padrão) do número de flores abertas por dia e da quantidade total de frutos formados naturalmente durante dois anos em plantas brevistilas e longistilas de quatro espécies de <i>Erythroxylum</i> em uma área de Cerrado do Brasil Central. Entre parênteses são mostrados a quantidade de indivíduos amostrados	105
Tabela 2. Resultados das análises dos modelos lineares generalizados (distribuição de erro quasi-poisson) averiguando os efeitos do morfo, ano de coleta e suas interações no número de flores abertas por dia e no número total de frutos produzidos por indivíduo em quatro espécies de <i>Erythroxylum</i> em uma área de Cerrado do Brasil Central. Os valores em negrito representam diferenças estatisticamente significativas	105
Tabela 3. Valores médios (\pm desvio padrão) de quatro variáveis relacionadas com a qualidade dos frutos e cinco relacionadas a qualidade das sementes de plantas brevistilas e longistilas de quatro espécies de <i>Erythroxylum</i> em uma área de Cerrado do Brasil Central. Após os valores médios e desvio padrão, são apresentados entre parênteses a quantidade de frutos ou sementes analisadas. Os valores de χ^2 (ou Z) e P dos modelos de cada variável para cada espécie também são mostrados. Em todos os casos, o grau de liberdade é igual a 1	106

Tabela 4. Resultados das análises dos modelos lineares generalizados mistos (distribuição poisson) averiguando alguns fatores que possam afetar a taxa de visitação (número de visitas/30 minutos; ver Material e Métodos para mais detalhes) em indivíduos de quatro espécies de <i>Erythroxylum</i> em uma área de Cerrado do Brasil Central. Os valores em negrito representam diferenças estatisticamente significativas	107
Tabela 5. Valores médios (\pm desvio padrão) da proporção de sementes predadas em plantas brevistilas e longistilas de quatro espécies de <i>Erythroxylum</i> em uma área de Cerrado do Brasil Central. Os valores estatísticos dos modelos lineares generalizados mistos (distribuição binomial) analisando diferenças entre morfos também são mostrados. Entre parênteses são indicados a quantidade de indivíduos amostrados	107
Tabela S1. Espécies de visitantes florais e sua frequência relativa de visitas em flores de quatro espécies distílicas de <i>Erythroxylum</i> em uma área de Cerrado do Brasil Central	108

RESUMO

Distília é um sistema floral caracterizado pela presença de dois morfos florais com posição recíproca das anteras e estigmas, sendo, amplamente, usado como modelo de estudos a respeito da evolução dos sistemas sexuais nas plantas. Geralmente, espécies distílicas exibem um sistema de incompatibilidade heteromórfico, bem como dimorfismos acessórios, como tamanho e número de grãos de pólen produzidos, e populações com razão entre morfos de 1:1 (isopleτία). Vários grupos distílicos, como *Erythroxyllum* (Erythroxyllaceae), passam por processos de especialização sexual, sendo a esterilidade masculina considerada o primeiro passo na evolução da unissexualidade floral. No entanto, para indivíduos com esterilidade masculina persistirem, eles devem ter alguma vantagem reprodutiva que compense a perda da função masculina. O objetivo geral desta tese foi analisar as características distílicas, a presença de especialização sexual e sua relação com possíveis compensações reprodutivas em diferentes populações de *E. campestre*, *E. deciduum*, *E. suberosum* e *E. tortuosum*. A tese está organizada em três capítulos, com os seguintes objetivos específicos: 1) analisar variações quanto a isopleτία, hercogamia recíproca e características do pólen; 2) investigar se as espécies apresentam especialização sexual, avaliando a esterilidade masculina e o sucesso reprodutivo entre os morfos florais; 3) comparar várias características reprodutivas entre os morfos florais com intuito de averiguar se plantas com especialização sexual exibem compensação reprodutiva. A maioria das populações foram isopléticas, com exceção de *E. campestre*. Espécies e populações exibiram variações no nível de reciprocidade perfeita e, geralmente, os órgãos baixos (estigma brevistila e antera longistila) foram mais recíprocos, com exceção de *E. deciduum*. As anteras das flores brevistilas produziram grãos de pólen maiores, mas em menor quantidade do que às anteras das flores longistilas. *Erythroxyllum campestre* é auto e intramorfo compatível, enquanto que as outras três espécies apresentam um sistema de incompatibilidade heteromórfico. Apesar de morfologicamente distílicas, as flores brevistilas de *E. campestre* e *E. deciduum* apresentaram maior esterilidade dos grãos de pólen do que às flores longistilas, sugerindo processo de especialização sexual via ginodioícia. A taxa de frutificação de um morfo floral não foi influenciada pela esterilidade masculina do morfo floral oposto. Considerando as várias características reprodutivas examinadas, variações entre morfos florais ocorreram apenas nas duas espécies com especialização sexual, porém nenhuma das variações evidenciaram uma vantagem reprodutiva feminina das plantas brevistilas.

Palavras-chave: distília; esterilidade masculina; ginodioícia; hercogamia recíproca; isopleτία; limitação polínica; sistema de incompatibilidade; sistema sexual; vantagem compensatória.

ABSTRACT

Distyly is a floral system characterized by the presence of two floral morphs with reciprocal placement of anthers and stigmas, and it has been largely used as a study model of evolution of sexual systems on plants. Usually, distylous species present a heteromorphic incompatibility system, as well as ancillary characters, such as pollen grain size and number, and populations with morph ratio of 1:1 (isoplethy). Many distylous groups, such *Erythroxyllum* (Erythroxyllaceae), go through processes of gender specialization, being the male sterility considered the first step for the evolution of unisexuality. However, for individuals with male sterility to persist in the population, they need a reproductive advantage that compensates for their loss of the male function. The main goal of this thesis is to analyze distylous characteristics, the presence of gender specialization and its relationship with the reproductive compensation in different populations of *E. campestre*, *E. deciduum*, *E. suberosum* and *E. tortuosum*. The thesis is divided into three chapters, with the following specific goals: 1) analyze variations on isoplethy, reciprocal herkogamy and pollen characteristics; 2) investigate if species present gender specialization, evaluating the male sterility and the reproductive success between morphs; 3) compare different reproductive characteristics between floral morphs in order to detect if plants with gender specialization present a reproductive compensation. Most populations were isoplethic, with exception of *E. campestre*. Species and populations displayed variations in the level of perfect reciprocity and low organs (S-stigmas and L-anthers) usually were more reciprocal, except in *E. deciduum*. Anthers of S-flowers often produced larger and fewer pollen grains than L-flowers. *Erythroxyllum campestre* is self and intra-morph compatible, whereas the other species present a heteromorphic incompatibility system. Although *E. campestre* and *E. deciduum* are morphologically distylous, they present S-flowers partially male-sterile, suggesting a gender specialization process through gynodioecy. Fruiting rate of one floral morph was not influenced by male sterility of the opposite morph. Considering the different reproductive characteristics examined, variations between floral morphs occurred only in the two species with gender specialization, despite none of them showed a female reproductive advantage of S-plants.

Keywords: compensatory advantage; distyly; gynodioecy; incompatibility system; isoplethy; male sterility; pollen limitation; reciprocal herkogamy; sexual system.

INTRODUÇÃO GERAL

A heterostilia é um polimorfismo floral geneticamente controlado em que as populações podem ser compostas por dois (distília) ou três (tristília) morfos florais que diferem de forma recíproca na altura de seus estigmas e anteras (Barrett & Shore 2008). A maior parte das espécies heterostílicas são distílicas, apresentando indivíduos com flores de estames curtos e estilete longo, denominado longistila, e outros com flores de estames longos e estilete curto, denominado brevistila (Ganders 1979b; Barrett 2002; Barrett & Shore 2008). Este arranjo recíproco da altura dos órgãos sexuais entre os morfos é conhecida como hercogamia recíproca, sendo considerada uma característica determinante para populações heterostílicas (Webb & Lloyd 1986). A hercogamia recíproca perfeita em uma população é alcançada quando as anteras de um morfo estão posicionadas exatamente na mesma posição (altura) que os estigmas do outro morfo. Além da variação morfológica na altura dos órgãos sexuais, as plantas heterostílicas, comumente, estão associadas a um sistema de incompatibilidade heteromórfico, de forma que apenas cruzamentos entre órgãos sexuais de altura recíproca (intermorfo) resultam em formação de sementes (Barrett & Richards 1990). Os morfos, geralmente, são encontrados em proporções semelhantes dentro das populações (isopleitia) como resultado da seleção dependente da frequência negativa, sendo tal característica regida por fatores genéticos e ecológicos, como o sistema de incompatibilidade heteromórfico e o serviço de polinização (Thompson *et al.* 2003; Pannell *et al.* 2005). Outros dimorfismos auxiliares também têm sido relacionados quanto a variação entre os morfos, principalmente em características dos grãos de pólen (tamanho, produção, escultura da exina) e do estigma (tamanho e forma; Ganders 1979b; Dulberger 1992; Costa *et al.* 2017).

A associação entre características morfológicas (hercogamia recíproca) e fisiológicas (sistema de incompatibilidade) fez com que os modelos evolutivos propostos para a heterostilia sugerissem diferentes caminhos evolutivos. No modelo evolutivo proposto por Charlesworth e Charlesworth (1979), o primeiro passo envolve a presença de um ancestral não hercogâmico (flor com estigma e antera na mesma altura) com altos níveis de endogamia, o que implicou na seleção evolutiva de um sistema de incompatibilidade antes da evolução da hercogamia recíproca. Por outro lado, Lloyd & Webb (1992) sugerem que o sistema de incompatibilidade evoluiria após o surgimento da hercogamia recíproca como resultado da especialização do pólen para a polinização legítima de um ancestral hercogâmico via dimorfismo estilar. O modelo de Lloyd & Webb (1992) alcançou apoio após estudos filogenéticos em *Narcissus* L. (Amaryllidaceae, Pérez-Barrales *et al.* 2006), *Lithodora* Griseb. (Boraginaceae, Ferrero *et al.*

2009) e *Primula* L. (Primulaceae, Mast *et al.* 2006). No entanto, a evolução de muitos grupos heterostílicos, como *Erythroxylum* P. Browne, permanece desconhecida, dada a falta de informações morfológicas, fisiológicas e filogenéticas. Por esta razão, informações sobre as características heterostílicas em diferentes espécies e populações de *Erythroxylum* podem ser úteis para futuros estudos evolutivos.

A heterostilia, até o presente momento, foi registrada em, aproximadamente, 28 famílias de Angiospermas, incluindo Erythroxylaceae (Barrett & Shore 2008). Esta família possui quatro gêneros (*Aneulophus* Benth., *Erythroxylum*, *Nectaropetalum* Engl. and *Pinacopodium* Exell & Mendonça) e cerca de 250 espécies com distribuição pantropical (Stevens 2001 onwards; Daly 2004). A maioria das espécies desta família pertence ao gênero *Erythroxylum* (cerca de 230 espécies), sendo este o único gênero representado na região Neotropical, tendo a América do Sul como o principal centro de diversidade e endemismo, especialmente o Brasil e a Venezuela (Daly 2004; Plowman & Hensold 2004; Loiola *et al.* 2007). No Brasil, foram registradas cerca de 114 espécies de *Erythroxylum* ocorrendo, principalmente, em florestas úmidas (Amazônia e Mata Atlântica) e no Cerrado (Loiola *et al.* 2007). Além de apresentar espécies heterostílicas (Ganders 1979a; Barros 1998; Pailler *et al.* 1998; Bianchi *et al.* 2000; Silva *et al.* 2007), *Erythroxylum* também possui espécies dióicas (Bawa & Opler 1975), ginodióicas (Domínguez *et al.* 1997; Avila-Sakar & Domínguez 2000) e agamospérmicas (Berry *et al.* 1991). Mesmo apresentando uma gama de sistemas de reprodução e possuindo grande importância ecológica e econômica (e.g., produção de fármacos e medicina popular), muito pouco se sabe a respeito da reprodução sexuada deste grupo de plantas. A variedade de estratégias reprodutivas nas espécies de *Erythroxylum* fazem com que este gênero se torne um excelente modelo para estudar os fatores que têm favorecido a evolução destes diferentes sistemas sexuais, principalmente os dimórficos.

Espécies do gênero *Erythroxylum* apresentam flores, geralmente, com 10 estames, distribuídos em dois verticilos (alternissépalos e opositissépalos) que podem ou não ter tamanhos diferentes dentro de uma mesma flor (Loiola *et al.* 2007). Devido a esta variação morfológica, houve certas discussões a respeito dos caminhos evolutivos do grupo, não existindo um consenso se espécies deste gênero possuem a distília ou a tristília como modelo precursor (primitivo). A interpretação de que a distília em *Erythroxylum* tenha evoluído da tristília, apenas por algumas espécies apresentarem flores com dois conjuntos de estames de tamanhos diferentes, parece ser equivocada (Ganders 1979a). Relatos de tristília (Burck 1895; Bahadur 1978) e de até quatro tipos florais morfológicamente diferentes em uma mesma espécie

de *Erythroxylum* (Payens 1958), provavelmente, são interpretações errôneas decorrentes de uma amostragem limitada ou de uma variação contínua dos comprimentos dos dois conjuntos de estames (Ganders 1979a; Barros 1998). Assim, não há evidências de que a variação dos comprimentos dos dois grupos de estames em *Erythroxylum* possa estar relacionada com a presença de mais de duas formas florais, podendo ser o gênero considerado, tipicamente, distílico.

Vários gêneros distílicos como *Bouvardia* Salisb., *Psychotria* L. e *Guettarda* L. (Rubiaceae) têm mostrado certa variação nos componentes morfofisiológicos típicos da distilia (Richards & Koptur 1993; Faivre & McDade 2001; Consolaro 2008; Novo *et al.* 2018). As variações nas características distílicas podem ocorrer entre flores de um mesmo indivíduo, entre indivíduos de uma dada população e entre populações de uma mesma espécie, e podem ser atribuídas à plasticidade fenotípica ou a um controle genético (Pailler & Thompson 1997; Faivre & McDade 2001). Embora observações em espécies e populações de *Erythroxylum* sejam escassas, variações no padrão distílico já foram encontradas, como autocompatibilidade e monomorfismo (populações com apenas um morfo floral, e.g., *E. amazonicum* Peyr., *E. novogranatense* (D. Morris) Hieron. e *E. undulatum* Plowman, Burck 1895; Arroyo & Cabrera 1978; Ganders 1979a; Berry *et al.* 1991). Essas variações podem ocorrer por vários motivos, tais como situações desfavoráveis à polinização intermorfo por meio da ineficiência ou ausência de polinizadores (Pérez-Barrales & Arroyo 2010), reprodução clonal (Haddadchi *et al.* 2014), perturbações ambientais (Aronne *et al.* 2014), especialização sexual (ver abaixo) e espécies com algum grau de autocompatibilidade (Consolaro *et al.* 2011; Zhou *et al.* 2017). Deste modo, mais estudos avaliando variações das características florais entre espécies e populações de *Erythroxylum* são importantes para que possam fornecer informações a respeito dos caminhos evolutivos, manutenção e/ou a perda da heterostilia em espécies deste gênero.

A heterostilia se originou de forma independente nas Angiospermas em diversas ocasiões, sendo um sistema floral completamente instável com transições para outros sistemas sexuais, como a ginodioicia e a dioicia (Barrett 2002; Rosas & Domínguez 2008). Estas transições, especificamente a heterostilia evoluindo para a dioicia, têm surgido em vários gêneros de plantas (e.g., *Cordia* L. (Boraginaceae), Opler *et al.* 1975; Lloyd 1979; *Coussarea* Aubl. e *Chassalia* Comm. ex Poir. (Rubiaceae), Beach & Bawa 1980; Pailler *et al.* 1998; *Nymphoides* Hill (Menyanthaceae), Barrett 1980), podendo ocorrer a partir de mudanças ecológicas, tais como a perda de polinizadores eficientes no fluxo de pólen intermorfo (Lloyd 1979; Beach & Bawa 1980; Pailler *et al.* 1998). Polinizadores ineficientes podem levar a uma

transferência assimétrica de pólen, favorecendo a função masculina do morfo com maior capacidade em exportar pólen, normalmente o brevistilo, e favorecendo a função feminina do morfo que recebe maior quantidade de pólen, normalmente o longistilo (Darwin 1877; Lloyd 1979). Embora a hipótese destes autores seja considerada clássica, a função de doar mais pólen nem sempre está relacionada ao morfo brevistilo e a de receber mais pólen legítimo ligado ao morfo longistilo (Lau & Bosque 2003; García-Robledo 2008). Independentemente de qual morfo atue como masculino ou feminino, todos estes trabalhos discutem que a transferência unidirecional de pólen pode eliminar a utilidade e, eventualmente, a funcionalidade dos estames do morfo que transporta menos pólen e dos pistilos do morfo que recebe menos pólen (Beach & Bawa 1980), o que geraria a especialização sexual.

Vários trabalhos teóricos e empíricos têm demonstrado que a heterostilia pode evoluir para a dioiccia quando a transferência de pólen entre os morfos é altamente assimétrica, sendo os polinizadores os principais agentes intermediadores da ruptura evolutiva da heterostilia (e.g., Beach & Bawa 1980; Muenchow & Grebus 1989; Barrett 1992; Paillet *et al.* 1998). Fatores genéticos intrínsecos também têm potencial de viabilizar a especialização sexual em espécies distílicas. As mutações de esterilidade podem ser expressas diferentemente entre os morfos, e levar um morfo a contribuir mais com uma função sexual (masculina ou feminina) do que o outro dentro da população (Schultz 1994; Domínguez *et al.* 1997). A especialização sexual pode trazer vantagens genéticas para uma população de planta e melhorar a aptidão reprodutiva dos indivíduos já que aumentaria sua diversidade genética reduzindo os níveis de autofecundação e depressão endogâmica (Charlesworth & Charlesworth 1978; Bawa 1980). Entretanto, para espécies heterostílicas, a seleção contra a autofecundação ou endogamia não pode ser colocada como uma possível "força motriz" para a evolução da dioiccia porque a maioria dos táxons apresentam sistema de incompatibilidade heteromórfico (Bawa 1980). Neste sentido, fatores ecológicos e não genéticos, como a atuação dos polinizadores realizando um fluxo de pólen assimétrico entre os morfos florais pode ser considerada a principal força seletiva que conduz a especialização sexual em espécies heterostílicas.

Em muitos casos, a esterilidade masculina é o primeiro passo na evolução da unissexualidade floral, favorecendo a função feminina (Schultz 1994; Charlesworth 1999), sendo, supostamente, um processo de especialização sexual generalizado em espécies distílicas de *Erythroxylum* (Domínguez *et al.* 1997; Avila-Sakar & Domínguez 2000; Cuevas *et al.* 2005; Del-Carlo & Buzato 2006; Silva *et al.* 2016). No entanto, a ocorrência de mutações de esterilidade masculina em alguns indivíduos hermafroditas resulta em uma desvantagem

gamética nestas plantas, uma vez que elas contribuem com genes para a próxima geração apenas via óvulos, enquanto que as plantas hermafroditas contribuem através do pólen e óvulos. Sendo assim, para que as plantas com esterilidade masculina sejam mantidas na população, elas devem apresentar alguma vantagem reprodutiva em relação às hermafroditas, compensando, assim, a perda da função sexual masculina (Charlesworth 1981; Gouyon & Couvet 1987; Delph *et al.* 1999). Esta compensação feminina pode ser adquirida por uma realocação de recursos em consequência do investimento reduzido na função masculina (Avila-Sakar & Domínguez 2000; Campbell 2000). No entanto, a quantidade de compensação reprodutiva necessária para manter plantas com esterilidade masculina na população depende do modo de herança da esterilidade masculina. No caso da herança nuclear, as plantas com esterilidade masculina devem ter pelo menos uma aptidão feminina duas vezes maior em relação às hermafroditas (Lewis 1941; Charlesworth & Charlesworth 1978; Van Damme & Van Damme 1986). Ao passo que, se a herança da mutação sexual for conduzida por genes citoplasmáticos, pequenas diferenças já são suficientes (Ross & Gregorius 1985; Frank 1989). Espécies de *Erythroxylum*, normalmente, têm apresentado uma esterilidade masculina com herança nuclear-citoplasmática (Domínguez *et al.* 1997; Del-Carlo & Buzato 2006), o que faz acreditar que a magnitude da compensação seja intermediária entre a esperada para as heranças nucleares e citoplasmáticas (Lewis 1941; Charlesworth 1981; Gouyon & Couvet 1987).

Em populações de *E. havanense* Jacq., as plantas brevistilas possuem grãos de pólen menos viáveis do que às plantas longistilas, exibindo um sistema sexual, parcialmente, ginodióico (Cuevas *et al.* 2005; Rosas *et al.* 2005). Diferentes estudos mostraram que plantas brevistilas de *E. havanense* com especialização sexual apresentam realocação de recursos na produção de mais frutos e sementes, maior velocidade e sucesso de maturação das sementes, melhor taxa de germinação e um desempenho vegetativo superior às plantas longistilas (Avila-Sakar & Domínguez 2000; Rosas *et al.* 2005). A vantagem compensatória dos indivíduos com esterilidade masculina também pode ser alcançada de outras formas, como maior habilidade competitiva, maior produção de flores e produção de sementes mais pesadas com maior capacidade de germinação (Shykoff *et al.* 2003; Dufay & Billard 2012). A prevalência dessas vantagens compensatórias das plantas com esterilidade masculina, cancelando sua desvantagem gamética em relação as plantas hermafroditas coespecíficas, são consistentes com modelos teóricos para a manutenção de indivíduos femininos em populações ginodióicas (Lewis 1941; Lloyd 1976; Gouyon & Couvet 1987). Entretanto, existem exceções à esta regra da vantagem compensatória feminina, indicando que as diferenças em alguns traços reprodutivos, por si só,

não podem explicar a manutenção das plantas com esterilidade masculina em todas as espécies (e.g., Alonso & Herrera 2001; Shykoff *et al.* 2003; García *et al.* 2005; Dufay *et al.* 2010; Dufay & Billard 2012).

A esterilidade masculina e suas vantagens compensatórias são parâmetros importantes na evolução da especialização sexual em plantas com sistemas sexuais dimórficos (e.g., heterostílicas, ginodióicas, androdióicas). A maioria dos estudos tem ignorado ou subestimado os efeitos combinados da esterilidade masculina com o contexto ecológico em que as plantas expressam a compensação feminina (mas ver, Marshal & Ganders 2001; Ramsey & Vaughton 2002; Ashman *et al.* 2004; Cole & Ashman 2005; Stone & Olson 2018). As interações bióticas são um dos principais componentes do cenário ecológico que influencia a evolução dos sistemas de reprodução das plantas (Ashman 2002). As interações com polinizadores (Stone & Olson 2018), herbívoros (Ashman *et al.* 2004; Cole & Ashman 2005), patógenos (Collin *et al.* 2002) e/ou predadores de sementes (Collin *et al.* 2002; Boege & Domínguez 2008) podem reforçar ou restringir os benefícios do exercício da especialização sexual se os animais responderem, diferentemente, entre os morfos florais. Em uma população de *E. havanense*, as plantas brevistilas com maior esterilidade masculina têm uma maior produção de frutos e sementes, porém apresentam uma maior taxa de sementes predadas, o que potencialmente reduziu a magnitude do seu efeito compensatório (Boege & Domínguez 2008). No entanto, para esta mesma população, os polinizadores parecem não ter um efeito sobre a compensação feminina, uma vez que a frequência de visitas entre os morfos foi igual (Domínguez *et al.* 1997).

Embora estudos tenham fornecido informações úteis sobre os aspectos distílicos e a esterilidade masculina, sendo esta última característica apontada por muitos autores como um fenômeno comum em *Erythroxylum*, poucos trabalhos ainda foram desenvolvidos com um conjunto de espécies deste gênero, onde apenas *E. havanense* é bem documentada (Domínguez *et al.* 1997; Avila-Sakar & Domínguez 2000; Cuevas *et al.* 2005; Rosas *et al.* 2005; Boege & Domínguez 2008; Rosas & Domínguez 2008). Desta forma, para o desenvolvimento da presente tese, buscou-se analisar as características distílicas e uma possível especialização sexual em diferentes populações de quatro espécies de *Erythroxylum* presentes no Cerrado, sendo elas *E. campestre* St. Hil., *E. deciduum* A. St. Hil., *E. suberosum* St. Hil. e *E. tortuosum* Mart. Também foi investigado se plantas com especialização sexual feminina exibem alguma vantagem reprodutiva compensatória. A tese está organizada em três capítulos, todos usando, como modelo de variação, espécies e/ou populações de *Erythroxylum*. Os dados do primeiro e segundo capítulo foram coletados em várias áreas de Cerrado do Brasil Central, avaliando para

as quatro espécies possíveis variações populacionais em uma escala regional. O primeiro capítulo analisa as características morfológicas distílicas das espécies e populações, investigando possíveis variações quanto a isoplelia, hercogamia recíproca e dimorfismos auxiliares (tamanho e produção de pólen). Especificamente, o segundo capítulo analisou variações temporais (além de espaciais) quanto a esterilidade dos grãos de pólen e o sucesso reprodutivo feminino das diferentes espécies e populações. Neste capítulo, também foi investigado se as populações exibem sistema de incompatibilidade heteromórfico e limitação polínica. Por fim, o terceiro capítulo comparou várias características reprodutivas entre os morfos florais de duas espécies com possível especialização sexual feminina e duas espécies sem esta especialização. Isto foi realizado para permitir um marco comparativo, investigando se possíveis variações reprodutivas entre morfos é resultado de um efeito compensatório (apenas espécies com especialização sexual apresentam diferenças entre morfos) ou de outros fatores (espécies sem especialização sexual também apresentam diferenças entre morfos).

REFERÊNCIAS

- Alonso, C. & Herrera, C.M. 2001. Neither vegetative nor reproductive advantages account for high frequency of male-steriles in Southern Spanish gynodioecious *Daphne laureola* (Thymelaeaceae). *American Journal of Botany* 88: 1016-1024.
- Aronne, G.; Buonanno, M. & Micco, V. 2014. Assessment of distyly syndrome in *Primula palinuri* Petagn. a rare species living on maritime vertical cliffs. *Plant Systematics and Evolution* 300: 917-924.
- Arroyo, M.T.K. & Cabrera, M. 1978. Preliminary self-incompatibility tests for some tropical cloud forest species in Venezuela. *Incomp. Newsletter* 8: 72-76.
- Ashman, T.L. 2002. The role of herbivores in the evolution of separate sexes from hermaphroditism. *Ecology* 83: 1175-1184.
- Ashman, T.L.; Cole, D.H. & Bradburn, M. 2004. Sex-differential resistance and tolerance to herbivory in a gynodioecious wild strawberry. *Ecology* 85: 2550-2559.
- Avila-Sakar, G. & Domínguez, C.A. 2000. Parental effects and gender specialization in a tropical heterostylous shrub. *Evolution* 54: 866-877.

- Bahadur, B. 1978. How many tristylous taxa? *Incompatibility Newsletter* 9: 94-104.
- Barrett, S.C.H. 1980. Dimorphic incompatibility and gender in *Nymphoides indica* (Menyanthaceae). *Canadian Journal of Botany* 58: 1938-1942.
- Barrett, S.C.H. 1992. Heterostylous genetic polymorphisms: model systems for evolutionary analysis. In: Barrett, S.C.H. (ed.) *Evolution and function of heterostyly*. Springer-Verlag, Berlin, Germany, p. 1-29.
- Barrett, S.C.H. 2002. The evolution of plant sexual diversity. *Nature Reviews Genetics* 3: 274-284.
- Barrett, S.C.H. & Richards, H.J. 1990. Heterostyly in tropical plants. *Memoirs of the New York Botanical Garden* 55: 35-61.
- Barrett, S.C.H. & Shore, J.S. 2008. New Insights on Heterostyly: Comparative Biology, Ecology and Genetics. In: Franklin-Tong, V.E. (ed.) *Self-incompatibility in flowering plants-evolution, diversity, and mechanisms*. Springer-Verlag, Berlin, Germany, p. 3-32.
- Barros, M.G. 1998. Sistemas de polinização em espécies simpátricas de *Erythroxylum* P. Br. (Erythroxylaceae) do Brasil. *Brazilian Journal of Botany* 21: 159-166.
- Bawa, K.S. 1980. Evolution of dioecy in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 11: 15-39.
- Bawa, K.S. & Opler, P.A. 1975. Dioecism in tropical forest trees. *Evolution* 29: 167-179.
- Beach, J.H. & Bawa, K.S. 1980. Role of pollinators in the evolution of dioecy from distyly. *Evolution* 34: 1138-1142.
- Berry, P.E.; Tobe, H. & Gómez, J.A. 1991. Agamospermy and the loss of distyly in *Erythroxylum undulatum* (Erythroxylaceae) from northern Venezuela. *American Journal of Botany* 78: 595-600.
- Bianchi, M.B.; Gibbs, P.E.; Prado, D.E. & Vesprini, J.L. 2000. Studies on the breeding systems of understory species of a Chaco woodland in NE Argentina. *Flora* 195: 339-348.
- Boege, K. & Domínguez, C.A. 2008. Pre-dispersal seed predation reduces the reproductive compensatory advantage of thrum individuals in *Erythroxylum havanense* (Erythroxylaceae). *Evolutionary Ecology* 22: 675-687.

- Burck, W. 1895. Over de eigenaardige heterostylie der bloemen van *Erythroxylon*. *Nederlandsch Kruidkundz Archief* 6: 254-262.
- Campbell, D. 2000. Experimental tests of sex-allocation theory in plants. *Trends in Ecology & Evolution* 15: 227-232.
- Charlesworth, D. 1981. A further study of the problem of the maintenance of females in ginodioecious species. *Heredity* 46: 27-39.
- Charlesworth, D. 1999. Theories of the evolution of dioecy. In: Geber, M.A.; Dawson, T.E. & Delph, L.F. (eds.) *Gender and Sexual Dimorphism in Flowering Plants*. Springer Verlag, Berlin. p. 33-60.
- Charlesworth, B. & Charlesworth, D. 1978. A model for the evolution of dioecy and gynodioecy. *American Naturalist* 112: 975-997.
- Charlesworth, B. & Charlesworth, D. 1979. The maintenance and breakdown of distyly. *The American Naturalist* 114: 499-513.
- Cole, D.H. & Ashman, T.L. 2005. Sexes show differential tolerance to spittlebug damage and consequences of damage for multi-species interactions. *American Journal of Botany* 92: 1708-1713.
- Collin, C.L.; Pennings, P.S.; Rueffler, *et al.* 2002. Natural enemies and sex: how seed predators and pathogens contribute to sex-differential reproductive success in a gynodioecious plant. *Oecologia* 131: 94-102.
- Consolaro, H.N. 2008. A distilia em espécies de Rubiaceae do bioma Cerrado. Tese de Doutorado, Universidade de Brasília.
- 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.
- Costa, J.; Castro, S.; Loureiro, J. & Barrett, S.C.H. 2017. Experimental insights on the function of ancillary pollen and stigma polymorphisms in plants with heteromorphic incompatibility. *Evolution* 71: 121-134.

- Cuevas, G.E.; Molina-Freaner, F.; Eguiarte, L.E. & Domínguez, C.A. 2005. Patterns of male sterility within and among populations of the distylous shrub *Erythroxyllum havanense* (Erythroxyllaceae). *Plant Ecology* 176: 165-172.
- Daly, D. 2004. Erythroxyllaceae. In: Smith, N.; Mori, S.A.; Henderson A.; Stevenson, D.W. & Heald, S.V. (eds.) *Flowering plants of the Neotropics*. Princeton University Press, Princeton. p. 143-145.
- Del-Carlo, S. & Buzato, S. 2006. Male sterility and reproductive output in distylous *Erythroxyllum suberosum* (Erythroxyllaceae). *Biological Journal of the Linnean Society* 88: 465-474.
- Delph, L.F.; Bailey, M.F. & Marr, D.L. 1999. Seed provisioning in gynodioecious *Silene acaulis* (Caryophyllaceae). *American Journal of Botany* 86:140-144.
- Domínguez, C.A.; Avila-Sakar, G.; Vizquez-Santana, S. & Mairquez-Guzmain, J. 1997. Morph-biased male sterility in the tropical distylous shrub *Erythroxyllum havanense* (Erythroxyllaceae). *American Journal of Botany* 84: 626-632.
- Dulberger, R. 1992. Floral polymorphisms and their functional significance in the heterostylous syndrome. In: Barrett, S.C.H. (ed.) *Evolution and function of heterostyly*. Berlin, Springer-Verlag. p. 41-84.
- Dufay, M.; Lahiani, E. & Brachi, B. 2010. Gender variation and inbreeding depression in gynodioecious-gynomonoecious *Silene nutans* (Caryophyllaceae). *International Journal of Plant Sciences* 171: 53-62.
- Dufay, M. & Billard, E. 2012. How much better are females? The occurrence of female advantage, its proximal causes and its variation within and among gynodioecious species. *Annals of Botany* 109: 505-519.
- Faivre, A.E. & McDade, L.A. 2001. Population-level variation in the expression of heterostyly in three species of Rubiaceae: does reciprocal placement of anthers and stigmas characterize heterostyly? *American Journal of Botany* 88: 841-853.
- Ferrero, V.; Arroyo, J.; Vargas, P.; Thompson, J.D. & Navarro, L. 2009. Evolutionary transitions of style polymorphisms in *Lithodora* (Boraginaceae). *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 11: 111-125.

- Frank, S.A. 1989. The evolutionary dynamics of cytoplasmic malesterility. *American Naturalist* 133: 345-376.
- Ganders, F.R. 1979a. Heterostyly in *Erythroxyllum coca* (Erythroxyllaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 78: 11-20.
- Ganders, F.R. 1979b. The biology of heterostyly. *New Zealand Journal of Botany* 17: 607-635.
- García, E.C; Márquez, G.J.; Domínguez, C.A. & Molina-Freaner, F. 2005. Evidence of gynodioecy in *Kallstroemia grandiflora* (Zygophyllaceae): microsporogenesis in hermaphrodite and female plants and lack of reproductive compensation. *International Journal of Plant Sciences* 166: 481-491.
- García-Robledo, C. 2008. Asymmetry in pollen flow promotes gender specialization in morphs of the distylous neotropical herb *Arcytophyllum lavarum* (Rubiaceae). *Evolutionary Ecology* 22: 743-755.
- Gouyon, P.H. & Couvet, D. 1987. A conflict between two sexes, females and hermaphrodites. In: Stearns, S.C. (ed.) *The evolution of sex and its consequences*. Birkhauser, Basel, Switzerland. p. 245-261.
- Haddadchi, A.; Fatemi, M. & Gross, C.L. 2014. Clonal growth is enhanced in the absence of a mating morph: a comparative study of fertile stylar polymorphic and sterile monomorphic populations of *Nymphoides Montana* (Menyanthaceae). *Annals of Botany* 113: 523-32.
- Lau, P. & Bosque, C. 2003. Pollen flow in the distylous *Palicourea fendleri* (Rubiaceae): an experimental test of the Disassortative Pollen Flow Hypothesis. *International Association for Ecology* 135: 593-600.
- Lewis, D. 1941. Male sterility in natural populations of hermaphrodite plants. *New Phytologist* 40: 56-63.
- Lloyd, D.G. 1976. The transmission of genes via pollen and ovules in gynodioecious angiosperms. *Theoretical Population Biology* 9: 299-316.
- Lloyd, D.G. 1979. Evolution toward dioecy in heterostylous populations. *Plant Systematics and Evolution* 131: 71-80.

- Lloyd, D.G. & Webb, C.J. 1992. The evolution of heterostyly. *In* Barrett S.C.H. [ed.], Evolution and function of heterostyly, 151-178, Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Loiola, M.I.B.; Agra, M.F.; Baracho, G.S. & Queiroz, R.T. 2007. Flora da Paraíba, Brasil: Erythroxylaceae Kunth. *Acta Botanica Brasilica* 21: 473-487.
- Marshall, M. & Ganders, F.R. 2001. Sex-biased seed predation and the maintenance of females in a gynodioecious plant. *American Journal of Botany* 88: 1437-1443.
- Mast, A.R.; Kelso, S. & Conti, E. 2006. Are any primroses (*Primula*) primitively monomorphic? *New Phytologist* 171: 605-616.
- Muenchow, G.E. & Grebus, M. 1989. The evolution of dioecy from distyly, reevaluation of the hypothesis of the loss of long-tongued pollinators. *American Naturalist* 133: 149-156.
- Novo, R.R.; Consolaro, H.; Almeida, N.M. & Castro, C.C. 2018. Floral biology of the velvetseed *Guettarda platypoda* DC. (Rubiaceae): Atypical distyly or style dimorphism. *Flora* 239: 62-70.
- Opler, P.A.; Baker, H.G. & Frankie, G.W. 1975. Reproductive biology of some Costa Rican *Cordia* species (Boraginaceae). *Biotropica* 7: 234-247.
- Pailler, 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.
- Pailler, T.; Humeau, L. & Thompson, J.D. 1998. Distyly and heteromorphic incompatibility in oceanic island species of *Erythroxylum* (Erythroxylaceae). *Plant Systematics and Evolution* 213: 187-198.
- Pannell, J.R.; Dorken, M.E. & Eppley, S.M. 2005. 'Haldane's Sieve' in a metapopulation: sifting through plant reproductive polymorphisms. *Trends in Ecology and Evolution*. 20: 374-379.
- Payens, J.P.D.W. 1958. Erythroxylaceae. *Flora Malesiana* 5: 543-552.
- Pérez-Barrales, R.; Vargas, P. & Arroyo, J. 2006. New evidence for the Darwinian hypothesis of heterostyly: breeding systems and pollinators in *Narcissus* sect. Apodanthi. *New Phytologist* 171: 553-567.

- 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.
- Plowman, T. & Hensold, N. 2004. Names, types and distribution of neotropical species of *Erythroxyllum* (Erythroxyllaceae). *Brittonia* 56: 1-53.
- Ramsey, M. & Vaughton, G. 2002. Maintenance of gynodioecy in *Wurmbea biglandulosa* (Colchicaceae): gender differences in seed production and progeny success. *Plant Systematics and Evolution* 232: 189-200.
- Richards, J.H. & Koptur, S. 1993. Floral Variation and distyly in *Guettarda scraba* (Rubiaceae). *American Journal of Botany* 80: 31-40.
- Rosas, L.F.; Pérez-Alquicira, J. & Domínguez, C.A. 2005. Environmentally induced variation in fecundity compensation in the morph-biased male-sterile distylous shrub *Erythroxyllum havanense* (Erythroxyllaceae). *American Journal of Botany* 92: 116-122.
- Rosas, L.F. & Domínguez, C.A. 2008. Male sterility, fitness gain curves and the evolution of gender specialization from distyly in *Erythroxyllum havanense*. *Journal of Evolutionary Biology* 22: 50-59.
- Ross, M.D. & Gregorius, H.R. 1985. Selection with gene-cytoplasm interactions. II. Maintenance of gynodioecy. *Genetics* 109: 427-439.
- Schultz, S.T. 1994. Nucleo-cytoplasmic male sterility and alternative routes to dioecy. *Evolution* 48: 1933-1945.
- Shykoff, J.A.; Kolokotronis, S.; Collin, C.L. & López-Villavicencio, M. 2003. Effects of male sterility on reproductive traits in gynodioecious plants: a meta-analysis. *Oecologia* 135: 1-9.
- Silva, F.J.T.; Schwade, M.R.M. & Webber, A.C. 2007. Fenologia, biologia floral e polinização de *Erythroxyllum* cf *macrophyllum* (Erythroxyllaceae), na Amazônia Central. *Revista Brasileira de Biociências* 5: 186-188
- Silva, L.; Fernandes, C.L.; Simão, E. & Nakamura, A.T. 2016. Development of anthers and pollen in Brazilian heterostylic species of *Erythroxyllum* (Erythroxyllaceae): an ecological approach. *Pakistan Journal of Botany* 48: 2047-2055.

- Stevens, P.F. 2001 onward. Angiosperm phylogeny website, version 14, June 2007 [more or less continuously updated]. Website <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/> [accessed 20 June 2018].
- Stone, J.D. & Olson, M.S. 2018. Pollination context alters female advantage in gynodioecious *Silene vulgaris*. *Journal of Evolutionary Biology* 31: 111-122.
- Thompson, J.D.; Barrett, S.C.H. & Baker, A.M. 2003. Frequency-dependent variation in reproductive success in *Narcissus*: implications for the maintenance of stigma-height dimorphism. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270: 949-953.
- Van Damme, J.M.M. & Van Damme, R. 1986. On the maintenance of gynodioecy: Lewis' result extended. *Journal of Theoretical Biology* 121: 339-350.
- 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.
- Zhou, W.; Barrett, S.C.H.; Li, H.-D.; Wu, Z.-K.; Wang, X.-J.; Wang, H. & Li, D.-Z. 2017. Phylogeographic insights on the evolutionary breakdown of heterostyly. *New Phytologist* 214: 1368-1380.

CAPÍTULO 1

Morphological inaccuracy in distylous *Erythroxylum* (Erythroxylaceae): comparisons between populations and species

Capítulo formatado nas normas da revista *American Journal of Botany*

ABSTRACT

PREMISE OF THE STUDY: Distylous species present two floral morphs with reciprocal placement of stigmas and anthers, which has been interpreted as a mechanism to promote disassortative pollination. However, the morphological evidence suggests that distylous species commonly present substantial variation in reciprocity between high (L-stigmas and S-anthers) and low (S-stigmas and L-anthers) organs that may affect the likelihood of disassortative pollination and consequently the stability of this floral polymorphism.

METHODS: Here, we investigated variation in morph ratio, stigma-anther reciprocity and diameter of pollen grains and pollen production in 26 populations of four *Erythroxylum* species from the Cerrado biome (Brazil).

KEY RESULTS: Most populations presented the 1:1 ratio, with the exception of *E. campestre*, that displayed L-biased, S-biased and S-monomorphic populations. All species fitted the morphological distylous floral syndrome, with some variations (L-flowers in all species presented two anther levels as opposed to S-flowers, that only showed one anther level). In all cases, we detected substantial deviations from perfect reciprocity, with total inaccuracy in reciprocity ranging between 9.39% and 42.94%. In almost all cases (with the exception of *E. deciduum*), most of the inaccuracy was generated by the high organs. Anthers of L-flowers often produced more pollen grains than S-flowers, but pollen from S-anthers was larger. Pollen production and size also varied between the two anther levels of L-morph.

CONCLUSIONS: Despite variations in the distylous morphological syndrome in *Erythroxylum* species and populations, we conclude that the most important morphological features of typical distyly seem to be conserved especially in *E. deciduum*, *E. suberosum* and *E. tortuosum*.

KEY WORDS: ancillary characters; Cerrado; heterostyly; inaccuracy; incompatibility system; isoplethy; monomorphism; morph bias; reciprocal herkogamy.

INTRODUCTION

Heterostyly is a genetically controlled sex polymorphism in which populations present two (distyly) or three (tristyly) floral morphs with reciprocal placement of stigmas and anthers, being distyly the most common sex polymorphism among angiosperms (Barrett and

Shore, 2008). The floral forms in distylous species include a long-styled morph (L-morph) and short-styled (S-morph) with the stigmas placed above and below the anthers, respectively, in such a way that anthers and stigmas are placed reciprocally between morphs (Barrett, 2002). This variation is considered a necessary condition to characterize a species as distylous. Many heterostylous species also present a diallelic incompatibility system that prevents self- and intramorph cross-fertilization (Barrett and Richards, 1990), as well as ancillary characters, such as pollen grain size and number (Ganders, 1979b; Dulberger, 1992), which often favor intermorph (disassortative) mating and prevent self and intramorph fertilization (Ganders, 1979b; Dulberger, 1992; Costa et al., 2017). Thus, when disassortative mating prevails, the maintenance of morphs in populations is guaranteed by means of negative frequency-dependent selection (Thompson et al., 2003; Pannell et al., 2005). Under conditions of disassortative mating, it is expected that the L- and S-morph yield progenies of similar fitness, maintaining both morphs at balance within populations. Deviations of the 1:1 ratio are often reported for species which show some degree of self-compatibility (Consolaro et al., 2011; Zhou et al., 2017) or with an increase of intramorph (assortative) mating in species that lack a diallelic incompatibility system (Baker et al., 2000; Barrett and Hodgins, 2006; Pérez-Barrales and Arroyo, 2010).

Heterostyly has been described in ca. 28 angiosperm families, including Erythroxylaceae (Barrett and Shore, 2008). Erythroxylaceae includes four tropical genera (*Aneulophus* Benth., *Erythroxylum* P. Browne, *Nectaropetalum* Engl. and *Pinacopodium* Exell & Mendonça) with ca. 250 species of flowering trees and shrubs (Stevens, 2001 onwards; Daly, 2004). The genus *Erythroxylum* is the largest of the family (ca. 230 species; Daly, 2004) and the only present in the neotropical region, being Brazil one of the main centers of diversity, with 114 species of which 74 are endemic (Plowman and Hensold, 2004; Loiola et al., 2007). The information available for heterostylous *Erythroxylum* species is limited, but it suggests that species present diallelic incompatibility system, with variation in the strength of the incompatibility reaction as well as the morph ratio (Ganders, 1979a; Barros, 1998; Pailler et al., 1998; Bianchi et al., 2000; Silva et al., 2007). The genus includes self-compatible and monomorphic species (populations with only one floral morph, e.g., *E. amazonicum* Peyr., *E. novogranatense* (D. Morris) Hieron. and *E. undulatum* Plowman; Burck, 1895; Arroyo and Cabrera, 1978; Ganders, 1979a; Berry et al., 1991), but the absence of phylogenetic information for the genus prevents testing whether monomorphic condition represents an ancestral condition or derived from distylous ancestors (Mast et al., 2006).

However, the morphological classification of the type of heterostyly present in *Erythroxyllum* species has been challenged by the fact that flowers present two stamen whorls that can have (or not) unequal length within the same flower. These variations have stimulated the debate regarding the evolutionary origin of heterostyly in *Erythroxyllum* species, and it has been argued that the presence of two sets of stamens of unequal length might be associated with a derived condition from a tristylous ancestor (Ganders, 1979a), similar to the variation displayed by *Oxalis alpina* (Rose) Rose ex R. Knuth (Baena-Díaz et al., 2017; Weller et al., 2007). However, other distylous groups such as *Linum* L. (Linaceae) and *Narcissus* L. (Amaryllidaceae) also include two sets of stamens of unequal length, but in these groups distyly does not seem to be derived from tristyly, but other stylar conditions (Dulberger, 1973; Arroyo and Barrett, 2000; Graham and Barrett, 2004; Pérez-Barrales et al., 2006; McDill et al., 2009; Santos-Gally et al., 2013; Ruiz-Martín et al., 2018). Therefore, the presence of two anther levels within a flower is not necessarily associated with the presence of more than two morphs, and reports of tristyly (Burck, 1895; Bahadur, 1978) and up to four floral morphs in some *Erythroxyllum* species (Payens, 1958) might be misguided interpretations from limited sampling or unmeasured continuous variation in lengths of two sets of stamens (Ganders, 1979a; Barros, 1998).

A detailed analysis of the variation in the position of reciprocal anthers and stigmas can provide a first step to investigate the ecological and evolutionary significance of heterostyly (Charlesworth and Charlesworth, 1979; Lloyd and Webb 1992a, b). Empirical evidence has shown that increasing reciprocity between morphs promotes disassortative pollination (Keller et al., 2014; Zhou et al., 2015; Jacquemyn et al., 2018; Wu et al., 2018; but see Simón-Porcar et al., 2015). Surprisingly, heterostylous species display substantial variation in reciprocal herkogamy, with anthers and stigmas often deviating from the position of their “compatible” reciprocal organ (Richards and Koptur, 1993; Paillet and Thompson, 1997; Thompson and Dommée, 2000; Faivre and McDade, 2001; Ferrero et al., 2009, 2011a, b; Keller et al., 2012; Sá et al., 2016; Armbruster et al., 2017). If the function of heterostyly relies on the close matching between reciprocal organs (Darwin, 1877), a morphological analysis of reciprocity can help elucidating whether heterostylous species and populations sit close to their phenotypic optimum, under the assumption that the position of high and low reciprocal organs represents the locations for pollen pick up and stigma contact on the body of pollinators to promote disassortative pollen transfer (Armbruster et al., 2006; Armbruster et al., 2009). Armbruster et al. (2017) recently developed a method to measure reciprocity based

on adaptive accuracy (Armbruster et al., 2009), which allows inferring the potential fitness cost associated with deviations of L- and S-anthers and stigmas from their phenotypic optimum (e.g., mean value of the reciprocal organ with low variation around the mean). The authors revealed that understanding deviations from perfect reciprocity requires investigating the contribution of high and low reciprocal organs to inaccuracy, suggesting that reciprocal herkogamy is a complex phenotypic trait subject to selection (Armbruster et al., 2017).

In the present study, we describe the morphological variation of heterostyly and some ancillary characters in four *Erythroxylum* species and populations from the Brazilian Cerrado, and provide an analytical description of the morphological variation of the polymorphisms and reciprocity in a plant group otherwise scarcely investigated. The variation in the position of anthers within the same flower provides unique opportunities to investigate the contribution of high and low organs to deviations from reciprocity, and infer its significance for the function of heterostyly in *Erythroxylum* species. The specific objectives include: (1) to describe the variation in morph frequency (e.g., isoplethy, anisoplethy and monomorphy) among species and populations; (2) to compare morphology of reproductive organs between morphs to determinate inaccuracy in reciprocity of high and low reciprocal organs, and (3) to investigate variations in ancillary characters (e.g., pollen grains production and size) of the different morphs of each species.

MATERIAL AND METHODS

Species and study areas - The species in this study include *E. campestre* A.St.-Hil., *E. deciduum* A.St.-Hil., *E. suberosum* A.St.-Hil. and *E. tortuosum* Mart (see Fig. 1). These species present small, pentamerous and actinomorph flowers, with creamy white petals and a sweet fragrance. Petals include a nectariferous ligule appendage at the base that together form a small tube. Flowers present 10 stamens with filaments fused at the base, forming a short staminal tube around the superior ovary. Stamens are organized in two whorls with five stamens, each with the whorls placed opposite to the sepals and petals, respectively. In the study species, flowers of the L-morph present the two stamen whorls are at different heights (Fig. 2), whereas in the S-morph, they are placed at similar height (other *Erythroxylum* species show variation in the position of anthers in S-flowers; Pailler et al., 1998). In both morphs flowers include three styles with tricarpelar and trilocular ovary that contain only one fertile locule with one ovule (Loiola et al., 2007; Silva et al., 2016). Fruits consist of red ovoid

drupes, which commonly produce a single seed. *Erythroxylum campestre* is self-compatible, with intra- and inter-morph crosses all compatible. The rest of the study species are self-incompatible, and only crosses between different floral morphs render fruits (R. Matias, unpublished data). *Erythroxylum campestre* has a sub-shrub habit, *E. suberosum* and *E. tortuosum* are shrubs and *E. deciduum* is an arboreous species. The four species are found in the Cerrado, the savannas in Central Brazil. In the present study, 11 Cerrado areas from Central Brazil (Goiás, Minas Gerais and Distrito Federal) were selected for the population survey (Fig. 3). Details (region, area name and coordinates) are included in Appendix S1; see Supplemental Data with this article. In total, 26 populations were surveyed along the 11 Cerrado areas (Fig. 3). The survey was completed between August and November 2015, which corresponds to the flowering period of the species in the areas of study.

Population morph ratio - Morph ratio was investigated in all populations of the four species (Fig. 3). Flowering individuals were scored to identify the species and verify the morph, allowing at least 3 meters between individuals of the same species to avoid repetition of the same genet. In all populations, chi-square (χ^2) analysis with Yates correction was used to assess if the morph ratio differed significantly from isoplethy (1:1), considering $\alpha = 0.05$.

Floral morphology and reciprocal herkogamy - Flowers were sampled from flowering individuals ($n = 1-3$ flowers per individual; 18-49 individuals per population) and fixed in 70% ethanol until measured in the laboratory. Flowers were photographed and measurements were obtained with ImageJ 1.45s software (Rasband, 2011; <http://imagej.nih.gov/ij/>). The traits measured included stigma and anthers height, using as reference point the top of the ovary (Fig. 2). For the L-morph, anther height was measured for the two whorls (Fig. 2). To morphologically characterize floral morphs of each species, we analyzed differences in stigmas and anthers height and stigma-anther separation (level of herkogamy) between morphs and populations with linear mixed-effects models using the lmer function in the lme4 package in R (Bates et al., 2015). The terms morph, population and the interaction effect were included in the models as fixed factors and individuals plants surveyed were used as a random factor. Significance of each factor was tested with type-II analysis of variance via the Anova function in the car package (Fox, 2015). In these analyses, monomorphic populations and highly anisoplethic populations were discarded.

To investigate variation in reciprocity, we used the adaptive inaccuracy method developed by Armbruster et al., (2009, 2017). The function of distylous flowers predicts that

the optimal position of L-stigmas is represented by the position of the anthers of the opposite morph and vice versa. Similarly, the optimum position of S-stigmas is represented by the position of L-anthers and vice versa. Hence, it is possible to estimate the level of maladaptation of reciprocity by studying the difference between population means of high organs and low organs. As different flowers of a same morph vary in the exact position of anthers and stigmas, with adaptive inaccuracy it is possible to incorporate the variance of organs to the estimates of reciprocity (Armbruster et al., 2009, 2017). We used the population mean and variance of each organ type to calculate adaptive inaccuracy values for high (L-stigmas [S] and S-anthers [A]; Eqn 1) and low organs (L-anthers [a] and S-stigmas [s]; Eqn 2). Given that L-flowers present two stamen whorls of different lengths (Fig. 2), the low organ level inaccuracy was estimated in two ways. Specifically, the measures of height of the two anthers heights (Aa and aa for upper and lower anther level, respectively) were analyzed together in the same equation (Eqn 2) by using the population mean and variance of the L-anthers without distinction of anther position. In addition, to better understand the contribution of each anther level to inaccuracy in reciprocity, we obtained adaptive inaccuracy considering upper (Eqn 3; Aa) and lower anthers (Eqn 4; aa) separately. In the equations presented below, letters with bars correspond to the population mean of organs whereas V corresponds to the variance of the organs (see Armbruster et al., 2009, 2017 for a detailed conceptual and mathematical development).

$$\text{Inaccuracy}_{\text{high organs}} = (\bar{A} - \bar{S})^2 + V_A + V_S \quad \text{Eqn 1}$$

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

$$\text{Inaccuracy}_{\text{low organs}} = (\overline{aA} - \bar{s})^2 + V_{aA} + V_s \quad \text{Eqn 3}$$

$$\text{Inaccuracy}_{\text{low organs}} = (\overline{aa} - \bar{s})^2 + V_{aa} + V_s \quad \text{Eqn 4}$$

The unit of inaccuracy is trait units squared, and the results of high and low organ inaccuracies were summed to provide a total inaccuracy value per population (see results). In order to establish comparisons between populations and species, values were standardized by the average height of all organs (e.g., dividing the inaccuracy estimates by the average² organ height) recorded for each population and adjusted to a proportional scale (Armbruster et al., 2017). In general, low values of inaccuracy correspond to high levels of reciprocity, e.g., close matching between reciprocal organs with low dispersal around the optimal values (Armbruster et al., 2009, 2017).

Pollen production and size - Diameter of pollen grains and pollen production were investigated in one population per species (populations of area five; Fig. 3). Ten to 26 flower buds in pre-anthesis from 8-21 individuals of each morph per species were randomly collected in the field and fixed in 70% alcohol to measure pollen diameter. Per floral morph, all anthers were squashed on a slide with acid fuchsin and the extracted pollen grains were photographed under an optical microscope (in L-flowers, this procedure was done separating anthers from the two whorls). Measures of the diameter of 10-15 pollen grains per sample were taken from photos with View 7.1 software. Pollen production was counted in one anther in the S-morph and two anthers in the L-morph (one per whorl) in 10 flowers from 6-10 individuals (1-2 flowers per individual) per morph. Anthers were removed and squashed on a microscope slide with a drop of acetic carmine to visualize and count all pollen grains under an optical microscope. For each species, we compared pollen diameter and pollen production between S-morph anthers (A) and the two height levels of L-morph anthers (aA and aa). The data were analyzed using linear mixed-effects models with anther type as a fixed factor and individual plant as random factor, using the lmer function in the lme4 package in R (Bates et al., 2015). To obtain the P-value of the models, we performed an analysis of variance as described above; when significant differences were detected, a post hoc Tukey test was conducted using glht function in the multcomp package (Hothorn et al., 2008) to identify differences between anthers types. Residuals analysis was used in order to ensure models assumptions were met (homoscedasticity and normal distribution). All analyses were performed in R statistical environment (R Core Team, 2017).

RESULTS

Population morph ratio - The number of L- and S-plants for all species and populations is presented in Table 1, and Fig. 3 shows the geographic distribution of populations and population morph ratio. For *E. campestre* only three out of eight populations presented 1:1 ratio of L- and S-plants, whereas the remaining five populations deviated from the isoplethic condition. Of these, one population was fixed for the S-morph, two presented deviations towards the L-morph and another two populations were S-biased. Populations of the remaining species presented L- and S-plants in equal proportions, with the exception of one population of *E. suberosum* and *E. tortuosum* that were biased towards the L-morph (see Table 1 for chi-square values and statistical significance of analyses).

Floral morphology and reciprocal herkogamy - The two floral morphs of all species are presented in Fig. 1. Average values of stigmas, anthers and stigma-anther separation of L- and S-flowers from all population are presented in Table 2, and graphical representations of sexual whorls of individual flowers ranked by order of increasing style length are presented in Fig. 4 for *E. campestre* and *E. deciduum* populations, and in Fig. 5 for *E. suberosum* and *E. tortuosum* populations. In general, herkogamy of L- and S-flowers in *E. campestre*, *E. suberosum* and *E. tortuosum* was pronounced, with few samples showing anthers and stigmas at the same height. In contrast, all four *E. deciduum* populations presented many L-flowers with stigmas located at the same height or below the upper anthers (Fig. 5), whereas S-flowers presented anthers and stigmas well separated.

In general, all species showed differences between morphs in the position of anthers and stigmas (see Tables 2, 3), and only *E. deciduum* showed no differences between populations. For stigma height, the interaction term morph * population was significant for all species except for *E. deciduum* (Table 3). The comparison for anther height using the upper anther of the L-morph showed that the interaction term was only significant for *E. campestre*, as opposed to the comparison with the lower anther of the L-morph, where the interaction term was statistically significant in all species. This suggests that the magnitude of differences between floral morph for those organs may not be the same across populations (Table 3). The analyses on herkogamy revealed different patterns of variation. For *E. suberosum* and *E. tortuosum*, there were no differences in the herkogamy level between morphs, whereas differences were found in *E. campestre* and *E. deciduum* (see Tables 2, 3). In general, S-flowers of *E. campestre* consistently displayed lower herkogamy, and the opposite pattern was found in *E. deciduum* (see Tables 2, 3). In all cases, species presented variation in herkogamy level between populations and the interaction term population * morph was statistically significant (Table 3), suggesting that patterns of variation in herkogamy are different across populations of all species.

The values of adaptive inaccuracy for species and populations are presented for high and low reciprocal organs (Table 4). Across populations, total inaccuracy on standardized scale ranged between 9.39% and 42.94%, with low inaccuracy values corresponding to high reciprocity. In general, average values per species (calculated as mean value across populations) showed that *E. suberosum* and *E. tortuosum* displayed the lowest inaccuracy values, ranging between 9.39% and 20.01% in *E. suberosum* and between 13.93% and 21.64% in *E. tortuosum* (Table 4). *Erythroxyllum deciduum* presented the largest total

inaccuracy of all species, ranging between 38.07% and 42.94%. *Erythroxyllum campestre* showed substantial variation in inaccuracy (Table 4), with some populations showing low values (e.g., population 11 with 13.48%) and others high values (e.g., inaccuracy of 41.16% in population 7), covering the range displayed by *E. deciduum* (largest inaccuracy values), and *E. suberosum* and *E. tortuosum* (lowest inaccuracy values). Within population and across species, inaccuracy showed a tendency to be larger for high organs in *E. campestre*, *E. suberosum* and *E. tortuosum* (Table 4), suggesting that in these species reciprocity is higher between S-stigmas and L-anthers (low organs) than L-stigmas and S-anthers (high organs). In contrast, inaccuracy values for low organs in *E. deciduum* were ca. three times larger than high organs, with values ranging within those observed in *E. suberosum* and *E. tortuosum* for the same organ level (Table 4), indicating that reciprocity is higher in high organs than low organs. The analysis to estimate the contribution of the two anther levels (Aa and aa) of L-flowers revealed that inaccuracy of lower anthers (aa) was substantially greater than upper anthers (Aa) in *E. campestre*, *E. suberosum* and *E. tortuosum* (Table 4). In contrast, upper anthers (Aa) of L-flowers in *E. deciduum* were associated with larger inaccuracy values compared to lower (aa) anthers (Table 4).

Pollen production and size - We identified differences between morphs in pollen characteristics (Table 5). In general, pollen from the S-morph was significantly larger than pollen from the two anther levels of the L-morph. *Erythroxyllum suberosum* was the only species in which pollen grains had similar size in upper L-anthers and S-anthers (Table 5). Comparisons between pollen size of upper and lower L-anthers showed significant differences in *E. suberosum*, with upper anthers having larger pollen grains. In *E. campestre*, *E. deciduum* and *E. tortuosum*, pollen grains of the two anther levels of the L-morph showed similar size (Table 5). The number of pollen grains per anther also displayed differences between morphs (Table 5). The upper and lower L-anthers of *E. campestre* and *E. tortuosum* produced greater quantity of pollen than anthers of the S-morph. In *E. deciduum* and *E. suberosum*, only the lower L-anthers produced more pollen than the S-anthers. In all species, the differences in the amount of pollen produced by upper and lower anthers of the L-morph were statistically significant, and lower anthers produced substantially more pollen than upper anthers (Table 5).

DISCUSSION

We investigated variations in morph ratio, position of male and female sexual organs, and pollen characteristics among different species and populations of *Erythroxylum*, a genus for which information on the variation of the heterostylous syndrome is scarce. Most populations were balanced for morph ratio, except for populations of *E. campestre*. We also found that most species and populations fitted the morphological heterostylous syndrome, but there was substantial variation in the position of sexual organs that affect the level of reciprocal herkogamy between morphs. The morphological syndrome also appeared associated with variation in pollen characteristics in the size and number of pollen grains produced by the two morphs, as well as in the two anther levels of L-flowers. Below, we discuss several ecological and genetic scenarios that might explain the variations observed, and discuss them in the context of the evolution and function of heterostyly.

The 1:1 ratio in heterostylous species is commonly associated with the presence of a heteromorphic incompatibility system and the promotion of disassortative mating. Changes in morph ratio seem to correlate with variations in the strength of the heteromorphic incompatibility system (Pailler and Thompson, 1997; Brys et al., 2008; Hodgins and Barrett, 2008), and the breakdown of the incompatibility system often results in the fixation of the L-morph (Consolaro et al., 2011; Zhou et al., 2012). In many heterostylous species and species with related polymorphisms, intra-morph crosses produce seeds, and morph ratio variation appears to be influenced by the relative contribution of assortative and disassortative pollen transfer, and the relative fertility of the morphs in relation to pollinator behavior (Arroyo et al., 2002; Barrett and Hodgins, 2006; Ferrero et al., 2017). In the present study, most of *Erythroxylum* populations were isoplethic, with the exception of *E. campestre*. Populations of this species displayed the most variation in morph-ratio, including isoplethic, L-biased, S-biased and S-monomorphic populations. Unlike the other *Erythroxylum* species included in this study, *E. campestre* is self-compatible, and all morph crosses form seeds, including autonomous selfing (Barros, 1998; R. Matias, unpublished data). Thus, variation in morph ratio for this species might be influenced by pollen transfer patterns and fitness differences between morphs, as well as stochastic events such as founder events, reduction of population size and habitat fragmentation, which are often accompanied by changes in the incompatibility system (Brys et al., 2008; Zhou et al., 2012). Previous research in *Erythroxylum* failed to describe the variation in morph ratio presented here (see Ganders, 1979a; Pailler et al., 1998). Further research is necessary to increase population sampling and

understand the mechanisms that govern population morph ratio and the fertility of the floral morphs.

The morphological variation observed in the study species fits the distylous syndrome, although all species displayed substantial variation in the position of anthers and stigmas, and therefore reciprocal herkogamy. This was particularly evident in *E. deciduum* (Fig. 4), a species in which all populations presented typical L-flowers, with clear separation between anthers and stigmas, and atypical L-flowers, with stigmas located at the same level or slightly below the upper L-anthers. Flowers of *E. laurifolium* Lam. displayed similar variation, with typical L-flowers and homostylous flowers with anthers and stigmas placed at the same height (Pailler et al., 1998). Homostyly is a term used to indicate flowers with absence of herkogamy in species whose ancestors were distylous (Ganders, 1979b). However, L-flowers of *Erythroxylum* in this study present two anther heights (Fig. 2), and in *E. deciduum* lower anthers never appeared placed at the same height as stigmas, becoming inappropriate the use of the term homostylous. Similar to the observations made in *E. laurifolium* (Pailler et al., 1998) and *Jasminum fruticans* L. (Oleaceae; Thompson and Dommée, 2000), we also found some L-flowers with twisted styles in all species. This twist can reduce herkogamy and place stigmas closer to upper anthers or slightly below, particularly in *E. deciduum*, the species with the lowest herkogamy in L-flowers. Less frequently, we also observed some S-styles twisted. It is possible that this characteristic might be associated with floral development, potentially affecting self-pollination (Pailler et al., 1998; Thompson and Dommée 2000), which remains to be tested.

We used the method developed by Armbruster et al. (2017) to estimate departures from perfect reciprocity based on adaptive inaccuracy. With adaptive accuracy, the mean and the variance are used to interpret the adaptive significance of the position of anthers and stigmas in relation to pollen pick-up and delivery, and pollinator behavior (Armbruster et al., 2009), which is critical for the function of heterostyly (Armbruster et al., 2006). In our analysis, *E. suberosum* and *E. tortuosum* presented the lowest total inaccuracy values, followed by *E. campestre* and *E. deciduum*. Hence, it can be assumed that reciprocity is higher in *E. suberosum* and *E. tortuosum* than *E. campestre* and *E. deciduum*, which was supported by the herkogamy comparisons between morphs (e.g., *E. suberosum* and *E. tortuosum* were the only species with similar herkogamy in L- and S-flowers). High organs (L-stigmas and S-anthers) in *E. campestre*, *E. suberosum* and *E. tortuosum* displayed larger inaccuracy values than low organs (S-stigmas and L-anthers), but the contribution to

inaccuracy from the two anther level of L-flowers differed substantially, with lower anthers contributing more to inaccuracy than upper anthers. In contrast, low organs in *E. deciduum* contributed more to inaccuracy, which appeared to be caused by the upper L-anthers. With the exception of *E. deciduum*, the results obtained seem to indicate that reciprocity in *Erythroxyllum* is generally larger in low organs. These findings agree with those reported in species of *Primula* L. (Primulaceae) and *Pulmonaria* L. (Boraginaceae), where the largest contribution to inaccuracy was generated by high organs, being attributed to developmental variation, which is often greater in large organs (Armbruster et al., 2017; Jacquemyn et al., 2018). Developmental variation in reciprocity can also be influenced by floral development, particularly in species with long floral tubes and epipetalous anthers (Thompson and Dommée, 2000; Faivre and McDade, 2001; Santos-Gally et al., 2015; Sá et al., 2016). However, *Erythroxyllum* species present open and relatively small corolla, with filaments only fused at the base of the ovary and not to the corolla, which probably has little developmental effects.

While evolutionary models predict a close matching between reciprocal anthers and stigmas (Darwin, 1877; Charlesworth and Charlesworth, 1979; Lloyd and Webb 1992a), the data presented here adds additional evidence that heterostylous species often depart from theoretical expectations of high reciprocity (Richards and Koptur, 1993; Paillet and Thompson, 1997; Thompson and Dommée, 2000; Faivre and McDade, 2001; Keller et al., 2012; Sá et al., 2016; Armbruster et al., 2017; Jacquemyn et al., 2018). In *Erythroxyllum*, variations of inaccuracy in reciprocity could lead to different levels of assortative and disassortative pollen transfer (Richards and Koptur, 1993; Thompson and Dommée, 2000; Kálmán et al., 2007; Ferrero et al., 2011b; Keller et al., 2012, 2014; Zhou et al., 2015; Jacquemyn et al., 2018). It is worth noting that inaccuracy values of the high and low reciprocal organs reported in our study were generally higher than those reported in *Primula* and *Pulmonaria* (Armbruster et al., 2017; Jacquemyn et al., 2018). It is also worth noting that a close matching between reciprocal anthers and stigmas is not a necessary condition to promote disassortative mating and maintain 1:1 morph ratio. For example, style dimorphic *Narcissus* species, which present two anther levels and narrow flower tubes, maintain high rates of disassortative mating despite the low reciprocity between anthers and stigmas (Barrett et al., 1997; Cesaro and Thompson, 2004; Cesaro et al., 2004; Simón-Porcar et al., 2015), which appears to be caused by pollinator behavior and fit (Pérez-Barrales and Arroyo, 2010; Simón-Porcar et al., 2014). *Erythroxyllum* species present relatively open corollas, and petals

include a nectariferous ligule appendage at the base that together form a small tube, inside which lower organs (S-stigmas and L-anthers) are included (Fig. 1). Pollination is often generalized (Domínguez et al., 1997; Barros, 1998) and, in the study species, insects visit flowers sideward to collect nectar, fitting closely with the flower tube. Hence, nectar seeking insects are more likely to contact low organs than high organs, which appear loosely exposed (R. Matias, personal observation). For example, in *E. campestre*, S-stigmas received more legitimate pollen than L-stigmas (J. Ribeiro, unpublished data). We acknowledge that our approach to investigate heterostyly in *Erythroxyllum* is purely morphological and the implications of the variation in reciprocity of high and low organs must be interpreted carefully. Future studies should incorporate a functional and comparative perspective to really understand the implications of inaccuracy in reciprocity in *Erythroxyllum* species for disassortative pollen transfer, including the contribution of the two anther levels in L-flowers (Jacquemyn et al., 2018). This will help to validate whether selection operates to increase reciprocity (Lloyd and Webb, 1992a, b), and the level of maladaptation of high and low reciprocal organs (Armbruster et al., 2017; Jacquemyn et al., 2018).

As expected for heterostylous species, the size and the number of pollen produced differed between morphs (Ganders, 1979b; Dessein et al., 2005). S-anthers generally presented larger pollen grains with lower pollen production compared to L-anthers. Also, there was variation in pollen properties for the two anther levels within the L-morph. Specifically, upper anthers in *E. suberosum* produced on average larger pollen grains (within the range of pollen grains produced by S-flowers) than lower anthers, and in all species lower anthers produced on average more pollen than upper anthers. Other *Erythroxyllum* species also present dimorphism in the size and number of pollen grains produced between morphs (Ganders, 1979a; Pailler et al., 1998; Bianchi et al., 2000), and within morph as reported in *E. coca* Lam. and *E. microphyllum* A. St.-Hil. (Ganders, 1979a; Bianchi et al., 2000). These variations may reflect a genetic control of resource allocation, with ‘fewer, larger’ or ‘more, smaller’ pollen grains in S- and L-flowers, respectively (Sarkissian and Harder, 2001). Anther size did not appear to differ between morph (R. Matias, personal observation), and any difference in pollen grain size would affect the quantity of pollen produced. The production of larger pollen grains in S-anthers has been interpreted as a mechanism to provide with more resources for pollen tubes to grow in long L-morph styles (Darwin, 1877; Ganders, 1979b). Many distylous species also present dimorphism in the stigmatic papillae. Specifically, stigmas of S- and L-flowers commonly present small and large stigmatic papillae,

respectively, that appears to interact better with the corresponding small pollen from L-anthers and large pollen from S-anthers (Dulberger, 1975; Costa et al., 2017). More studies are needed in *Erythroxyllum* to characterize the variation in pollen and in stigmatic papillae to understand its significance for the fertility of the floral morphs.

In this study, we described the sources of variation in the distylous morphological syndrome in *Erythroxyllum* species and populations. Despite these variations, we conclude that the most important morphological features of typical distylous seem to be conserved especially in *E. deciduum*, *E. suberosum* and *E. tortuosum*. Typical distyly is also present in *E. campestre*, as provided by the differences in floral morphology and pollen characteristics between morphs; however, variations in morph ratio and the loss of incompatibility system (Barros, 1998; R. Matias, unpublished data) may indicate failure in the function of the polymorphism. Although we registered isoplethy in some populations of *E. campestre*, the majority presented deviations in morph ratio, and even a monomorphic population was registered. Monomorphism might be a derived condition, as reported in other groups at the level of species and population (Mast et al., 2006; Zhou et al., 2012; Ruiz-Martín et al., 2018). However, a robust molecular phylogeny, not yet available for *Erythroxyllum*, is necessary to verify if the variations found at the level of populations and species fit the transitions proposed by evolutionary models of heterostyly (Charlesworth and Charlesworth, 1979; Lloyd and Webb, 1992a, b). The findings in the present study suggest that *Erythroxyllum* constitutes an excellent model system to further investigate the ecological and adaptive significance of reciprocity and the function of heterostyly. These will bring insights to understand the ecological and genetic factors for the origin, maintenance and loss of heterostyly.

LITERATURE CITED

- Armbruster, W.S., R. Pérez-Barrales, J. Arroyo, M.E. Edwards, and P. Vargas. 2006. Three-dimensional reciprocity of floral morphs in wild flax (*Linum suffruticosum*): a new twist on heterostyly. *New Phytologist* 171: 581–590.
- Armbruster, W.S., T.F. Hansen, C. Pélabon, R. Pérez-Barrales, and J. Maad. 2009. The adaptive accuracy of flowers: measurement and microevolutionary patterns. *Annals of Botany* 103: 1529–1545.

- Armbruster, W.S., G.H. Bolstad, T.F. Hansen, B. Keller, E. Conti, and C. Pélabon. 2017. The measure and mismeasure of reciprocity in heterostylous flowers. *New Phytologist* 215: 906–917.
- Arroyo, J., and S.C.H. Barrett. 2000. Discovery of distyly in *Narcissus* (Amaryllidaceae). *American Journal of Botany* 87: 748–751.
- Arroyo, J., S.C.H. Barrett, R. Hidalgo, and W.W. Cole. 2002. Evolutionary maintenance of stigma-height dimorphism in *Narcissus papyraceus* (Amaryllidaceae). *American Journal of Botany* 89: 1242–1249.
- Arroyo, M.T.K., and M. Cabrera. 1978. Preliminary self-incompatibility tests for some tropical cloud forest species in Venezuela. *Incompatibility Newsletter* 8: 72–76.
- Baena-Díaz, F., J. Fornoni, P. Sosenski, S.G. Weller, and C.A. Domínguez. 2017. Pollen and stigma size changes during the transition from tristylous to distylous in *Oxalis alpina* (Oxalidaceae). *Plant Biology* 19: 994–1002.
- Bahadur, B. 1978. How many tristylous taxa? *Incompatibility Newsletter* 9: 94–104.
- Baker, A.M., J.D. Thompson, and S.C.H. Barrett. 2000. Evolution and maintenance of stigma-height dimorphism in *Narcissus*. I. Floral variation and style-morph ratios. *Heredity* 84: 502–513.
- Barrett, S.C.H. 2002. The evolution of plant sexual diversity. *Nature Reviews Genetics* 3: 274–284.
- Barrett, S.C.H., and H.J. Richards. 1990. Heterostyly in tropical plants. *Memoirs of the New York Botanical Garden* 55: 35–61.
- Barrett, S.C.H., W.W. Cole, J. Arroyo, M.B. Cruzan, and D.G. Lloyd. 1997. Sexual polymorphisms in *Narcissus triandrus* (Amaryllidaceae): is this species tristylous? *Heredity* 78: 135–145.
- Barrett, S.C.H., and K.A. Hodgins. 2006. Floral design and the evolution of asymmetrical mating. In L.D. Harder, and S.C.H. Barrett [eds.], *Ecology and evolution of flowers*, 239–255. Oxford University Press, Oxford, UK.

- Barrett, S.C.H., and J.S. Shore. 2008. New Insights on Heterostyly: Comparative Biology, Ecology and Genetics. In V.E. Franklin-Tong [ed.], *Self-incompatibility in flowering plants-evolution, diversity, and mechanisms*, 3–32. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Barros, M.G. 1998. Sistemas de polinização em espécies simpátricas de *Erythroxylum* P. Br. (Erythroxylaceae) do Brasil. *Brazilian Journal of Botany* 21: 159–166.
- Bates, D., M. Maechler, B. Bolcher, and S. Walker. 2015. Fitting linear mixed-effects models using lme4. *Journal of Statistical Software* 67: 1–48.
- Berry, P.E., H. Tobe, and J.A. Gómez. 1991. Agamospermy and the loss of distyly in *Erythroxylum undulatum* (Erythroxylaceae) from northern Venezuela. *American Journal of Botany* 78: 595–600.
- Bianchi, M.B., P.E. Gibbs, D.E. Prado, and J.L. Vesprini. 2000. Studies on the breeding systems of understorey species of a Chaco woodland in NE Argentina. *Flora* 195: 339–348.
- Brys, R., H. Jacquemyn, and T. Beeckman. 2008. Morph-ratio variation, population size and female reproductive success in distylous *Pulmonaria officinalis* (Boraginaceae). *Journal of Evolutionary Biology* 21: 1281–1289.
- Burck, W. 1895. Over de eigenaardige heterostylie der bloemen van *Erythroxylon*. *Nederlandsch Kruidkundzg Archief* 6: 254–262.
- Cesaro, A.C., S.C.H. Barrett, S. Maurice, B.E. Vaissiere, and J.D. Thompson. 2004. An experimental evaluation of self-interference in *Narcissus assoanus*: functional and evolutionary implications. *Journal of Evolutionary Biology* 17: 1367–1376.
- Cesaro, A.C., and J.D. Thompson. 2004. Darwin's cross-promotion hypothesis and the evolution of stylar polymorphism. *Ecology Letters* 7: 1209–1215.
- Charlesworth, B., and D. Charlesworth. 1979. The maintenance and breakdown of distyly. *The American Naturalist* 114: 499–513.
- Consolaro, H., S.C.S Silva, and P.E. Oliveira. 2011. Breakdown of distyly and pin-monomorphism in *Psychotria carthagenensis* Jacq. (Rubiaceae). *Plant Species Biology* 26: 24–32.

- Costa, J., S. Castro, J. Loureiro, and S.C.H. Barrett. 2017. Experimental insights on the function of ancillary pollen and stigma polymorphisms in plants with heteromorphic incompatibility. *Evolution* 71: 121–134.
- Daly, D. 2004. Erythroxylaceae. In N. Smith, S.A. Mori, A. Henderson, D.W. Stevenson, and S.V. Heald [eds.], *Flowering plants of the Neotropics*, 143–145. Princeton University Press, Princeton, USA.
- Darwin, C. 1877. *The Different Form of Flowers of the Same Species*. John Murray, London, UK.
- Dessein, S., H. Ochoterena, P. De Block, F. Lens, E. Robbrecht, P. Schols, E. Smets, et al. 2005. Palynological characters and their phylogenetic signal in Rubiaceae. *The Botanical Review* 71: 354–414.
- Domínguez, C.A., G. Avila-Sakar, S. Vizquez-Santana, and J. Mairquez-Guzmain. 1997. Morph-biased male sterility in the tropical distylous shrub *Erythroxylum havanense* (Erythroxylaceae). *American Journal of Botany* 84: 626–632.
- Dulberger, R. 1973. Distyly in *Linum pubescens* and *L. mucronatum*. *Botanical Journal of the Linnean Society* 66: 117–126.
- Dulberger, R. 1975. Intermorph structural differences between stigmatic papillae and pollen grains in relation to incompatibility in Plumbaginaceae. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 188: 257–274.
- Dulberger, R. 1992. Floral polymorphisms and their functional significance in the heterostylous syndrome. In S.C.H. Barrett [ed.], *Evolution and function of heterostyly*, 41–84. Springer, Berlin, Germany.
- Faivre, A.E., and L.A. McDade. 2001. Population-level variation in the expression of heterostyly in three species of Rubiaceae: does reciprocal placement of anthers and stigmas characterize heterostyly? *American Journal of Botany* 88: 841–853.
- Ferrero, V., J. Arroyo, P. Vargas, J.D. Thompson, and L. Navarro. 2009. Evolutionary transitions of style polymorphisms in *Lithodora* (Boraginaceae). *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 11: 111–125.

- Ferrero, V., I. Chapela, J. Arroyo, and L. Navarro. 2011a. Reciprocal style polymorphisms are not easily categorised: the case of heterostyly in *Lithodora* and *Glandora* (Boraginaceae). *Plant Biology* 13: 7–18.
- Ferrero, V., S. Castro, J.M. Sánchez, and L. Navarro. 2011b. 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., S.C.H. Barrett, D. Rojas, J. Arroyo, and L. Navarro. 2017. Associations between sex-organ deployment and morph bias in related heterostylous taxa with different stylar polymorphisms. *American Journal of Botany* 104: 1–12.
- Fox, J. 2015. Applied regression analysis and generalized linear models, 3rd ed. Sage, London, UK.
- Ganders, F.R. 1979a. Heterostyly in *Erythroxylum coca* (Erythroxylaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 78: 11–20.
- Ganders, F.R. 1979b. The biology of heterostyly. *New Zealand Journal of Botany* 17: 607–635.
- Graham, S.W., and S.C.H. Barrett. 2004. Phylogenetic reconstruction of the evolution of stylar polymorphisms in *Narcissus* (Amaryllidaceae). *American Journal of Botany* 91: 1007–1021.
- Hodgins, K.A., and S.C.H. Barrett. 2008. Asymmetrical mating patterns and the evolution of biased style-morph ratios in a tristylous daffodil. *Genetics Research* 90: 3–15.
- Hothorn, T., F. Bretz, and P. Westfall. 2008. Simultaneous inference in general parametric models. *Biometrical Journal* 50: 346–363.
- Jacquemyn, H., M. Gielen, and R. Brys. 2018. Is sexual organ reciprocity related to legitimate pollen deposition in distylous *Pulmonaria* (Boraginaceae)? *Oikos* “In press”.
- Kálmán, K., A. Medvegy, Z. Péntzes, and E. Mihalik. 2007. Morph-specific variation of floral traits associated with reciprocal herkogamy in natural populations of *Primula vulgaris* and *Primula veris*. *Plant Systematics and Evolution* 268: 15–27.

- Keller, B., J.M. de Vos, and E. Conti. 2012. Decrease of sexual organ reciprocity between heterostylous primrose species, with possible functional and evolutionary implications. *Annals of Botany* 110: 1233–1244.
- Keller, B., J.D. Thomson, and E. Conti. 2014. Heterostyly promotes disassortative pollination and reduces sexual interference in Darwin's primroses: evidence from experimental studies. *Functional Ecology* 28: 1413–1425.
- Lloyd, D.G., and C.J. Webb. 1992a. The evolution of heterostyly. In S.C.H. Barrett [ed.], *Evolution and function of heterostyly*, 151–178. Springer, Berlin, Germany.
- Lloyd, D.G., and C.J. Webb. 1992b. The selection of heterostyly. In S.C.H. Barrett [ed.], *Evolution and function of heterostyly*, 179–207. Springer, Berlin, Germany.
- Loiola, M.I.B., M.F. Agra, G.S. Baracho, and R.T. Queiroz. 2007. Flora da Paraíba, Brasil: Erythroxylaceae Kunth. *Acta Botanica Brasilica* 21: 473–487.
- Mast, A.R., S. Kelso, and E. Conti. 2006. Are any primroses (*Primula*) primitively monomorphic? *New Phytologist* 171: 605–616.
- McDill, J., M. Reppinger, B.B. Simpson, and J.W. Kadereit. 2009. The Phylogeny of *Linum* and Linaceae Subfamily Linoideae, with Implications for Their Systematics, Biogeography, and Evolution of Heterostyly. *Systematic Botany* 34: 386–405.
- Pailler, T., and J.D. Thompson. 1997. Distyly and variation in heteromorphic incompatibility in *Gaertnera vaginata* (Rubiaceae) endemic to La Reunion Island. *American Journal of Botany* 84: 315–327.
- Pailler, T., L. Humeau, and J.D. Thompson. 1998. Distyly and heteromorphic incompatibility in oceanic island species of *Erythroxylum* (Erythroxylaceae). *Plant Systematics and Evolution* 213: 187–198.
- Pannell, J.R., M.E. Dorken, and S.M. Eppley. 2005. 'Haldane's Sieve' in a metapopulation: sifting through plant reproductive polymorphisms. *Trends in Ecology & Evolution* 20: 374–379.
- Payens, J.P.D.W. 1958. Erythroxylaceae. *Flora Malesiana* 5: 543–552.

- Pérez-Barrales, R., P. Vargas, and J. Arroyo. 2006. New evidence for the Darwinian hypothesis of heterostyly: breeding systems and pollinators in *Narcissus* sect. Apodanthi. *New Phytologist* 171: 553–567.
- Pérez-Barrales, R., and J. Arroyo. 2010. Pollinator shifts and the loss of style polymorphism in *Narcissus papyraceus* (Amaryllidaceae). *Journal of Evolutionary Biology* 23: 1117–1128.
- Plowman, T., and N. Hensold. 2004. Names, types and distribution of neotropical species of *Erythroxylum* (Erythroxylaceae). *Brittonia* 56: 1–53.
- R Core Team. 2017. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Website <http://www.R-project.org>
- Rasband, W.S. 2011. Image J, version 1.45s. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA.
- Richards, J.H, and S. Koptur. 1993. Floral Variation and distyly in *Guettarda scraba* (Rubiaceae). *American Journal of Botany* 80: 31–40.
- Ruiz-Martín, J., R. Santos-Gally, M. Escudero, J.J. Midgley, R. Pérez-Barrales, and J. Arroyo. 2018. Style polymorphism in *Linum* (Linaceae): a case of Mediterranean parallel evolution? *Plant Biology* 20: 100–111.
- Sá, T., M.T. Furtado, V. Ferrero, R. Pérez-Barrales, E.B. Rodrigues, I.G. Santos, and H. Consolaro. 2016. Floral biology, reciprocal herkogamy and breeding system in four *Psychotria* species (Rubiaceae) in Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society* 182: 689–707.
- Santos-Gally, R., A. Gonzalez-Voyer, and J. Arroyo. 2013. Deconstructing heterostyly: the evolutionary role of incompatibility system, pollinators, and floral architecture. *Evolution* 67: 2072–2082.
- Santos-Gally, R., A. de Castro, R. Pérez-Barrales, and J. Arroyo. 2015. Styler polymorphism on the edge: unusual flower traits in Moroccan *Narcissus broussonetii* (Amaryllidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 177: 644–656.
- Sarkissian, T.S., and L.D. Harder. 2001. Direct and indirect responses to selection on pollen size in *Brassica rapa* L. *Journal of Evolutionary Biology* 14: 456–468.

- Silva, L., C.L. Fernandes, E. Simão, and A.T. Nakamura. 2016. Development of anthers and pollen in Brazilian heterostylic species of *Erythroxylum* (Erythroxylaceae): an ecological approach. *Pakistan Journal of Botany* 48: 2047–2055.
- Silva, F.J.T., M.R.M. Schwade, and A.C. Webber. 2007. Fenologia, biologia floral e polinização de *Erythroxylum cf macrophyllum* (Erythroxylaceae), na Amazônia Central. *Revista Brasileira de Biociências* 5: 186–188.
- Simón-Porcar, V.I., R. Santos-Gally, and J. Arroyo. 2014. Long-tongued insects promote disassortative pollen transfer in style-dimorphic *Narcissus papyraceus* (Amaryllidaceae). *Journal of Ecology* 102: 116–125.
- Simón-Porcar, V.I., T.R. Meagher, and J. Arroyo. 2015. Disassortative mating prevails in style-dimorphic *Narcissus papyraceus* despite low reciprocity and compatibility of morphs. *Evolution* 69: 2276–2288.
- Stevens, P.F. 2001 onward. Angiosperm phylogeny website, version 14, June 2007 [more or less continuously updated]. Website <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/> [accessed 20 June 2018].
- Thompson, J.D., and B. Dommée. 2000. Morph-specific patterns of variation in stigma height in natural populations of distylous *Jasminum fruticans*. *New Phytologist* 148: 303–314.
- Thompson, J.D., S.C.H. Barrett, and A.M. Baker. 2003. Frequency-dependent variation in reproductive success in *Narcissus*: implications for the maintenance of stigma-height dimorphism. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 270: 949–953.
- Weller, S.G., C.A. Domínguez, F.E. Molina-Freaner, J. Fornoni, and G. LeBuhn. 2007. The evolution of distyly from tristyly in populations of *Oxalis alpina* (Oxalidaceae) in the Sky Islands of the Sonoran Desert. *American Journal of Botany* 94: 972–985.
- Wu, L.-Y., F.-F. Chang, S.-J. Liu, W.S. Armbruster, and S.-Q. Huang. 2018. Heterostyly promotes compatible pollination in buckwheats: Comparisons of intraflower, intraplant, and interplant pollen flow in distylous and homostylous *Fagopyrum*. *American Journal of Botany* 105: 108–116.

Zhou, W., S.C.H. Barrett, H. Wang, and D.-Z. Li. 2012. Loss of floral polymorphism in heterostylous *Luculia pinceana* (Rubiaceae): a molecular phylogeographic perspective. *Molecular Ecology* 21: 4631–4645.

Zhou, W., S.C.H. Barrett, H. Wang, and D.-Z. Li. 2015. Reciprocal herkogamy promotes disassortative mating in a distylous species with intramorph compatibility. *New Phytologist* 206: 1503–1512.

Zhou, W., S.C.H. Barrett, H.-D. Li, Z.-K. Wu, X.-J. Wang, H. Wang, and D.-Z. Li. 2017. Phylogeographic insights on the evolutionary breakdown of heterostyly. *New Phytologist* 214: 1368–1380.

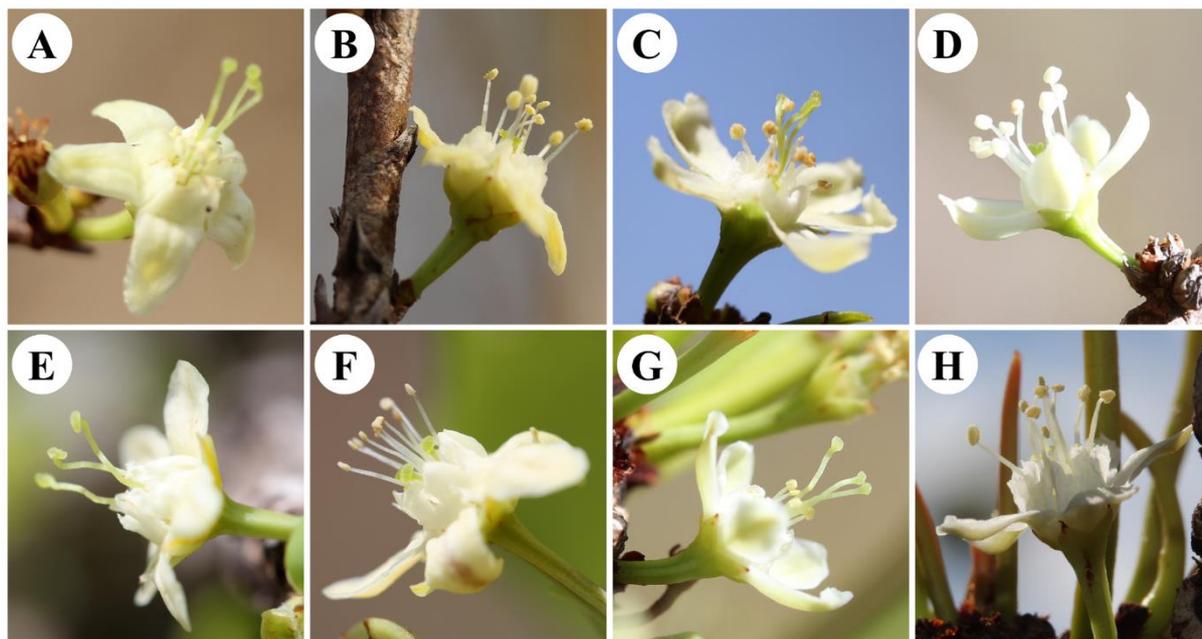


FIGURE 1. Flowers of *Erythroxylum* studied in the Cerrado of Central Brazil, showing L- and S-morph of *E. campestre* (A, B), *E. deciduum* (C, D), *E. suberosum* (E, F) and *E. tortuosum* (G, H).

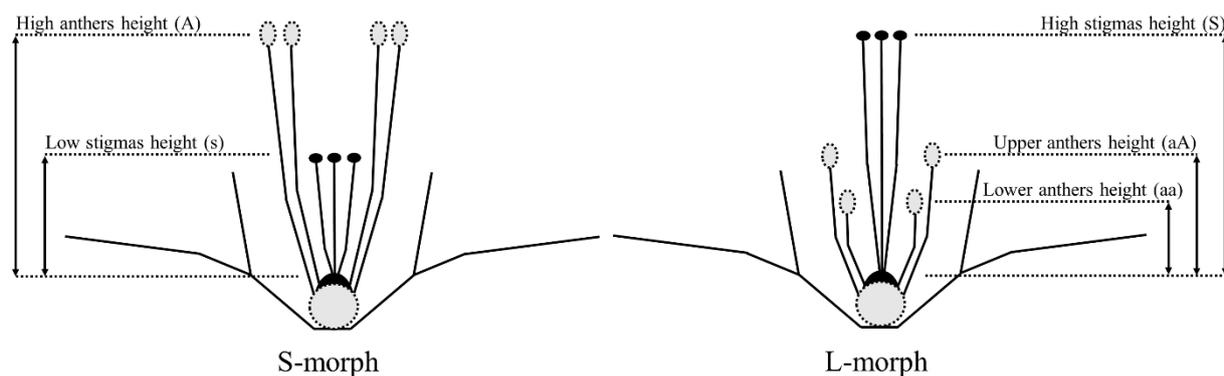


FIGURE 2. Schematic representation of the relative position of stigmas and anthers in S- and L-flowers of *Erythroxylum* species studied and the flower traits measured. Letters in parentheses correspond to the initials used for each type of organ in the analysis of reciprocity. For clarity, only four of 10 stamens per flower are drawn (two per whorl).

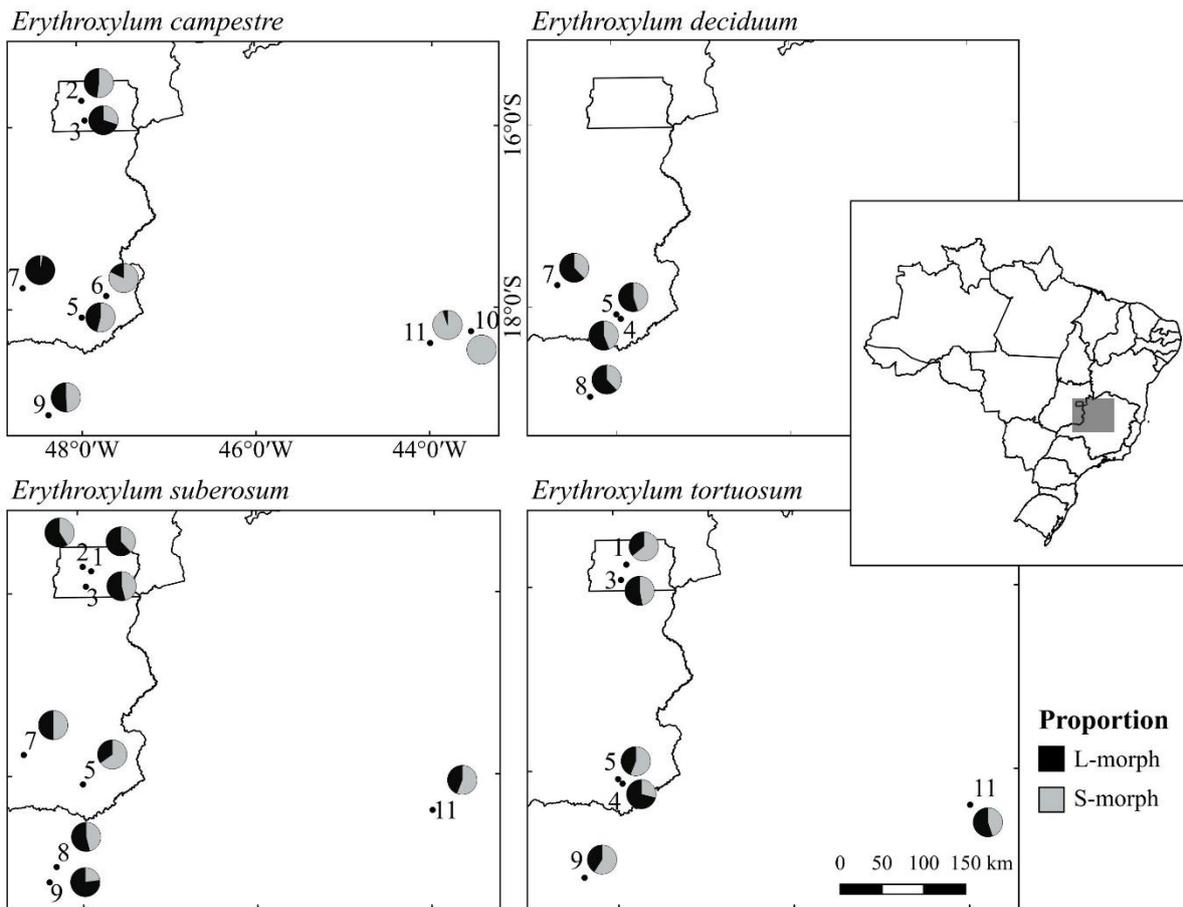


FIGURE 3. Geographic distribution and variation in morph ratio in populations of four *Erythroxylum* species studied in 11 Cerrado areas of Central Brazil. Black and gray segments indicate the proportions of the L- and S-morph, respectively. Numbers correspond to the code of each area: 1 - Parque Nacional; 2 - APA do Paranoá; 3 - RECOR; 4 - Pasto do Pedrinho; 5 - Fazenda Pé do Morro; 6 - Pires Belo; 7 - PESCAN; 8 - Clube Caça & Pesca Itororó; 9 - Estação Ecológica do Panga; 10 - Ribeirão dos Infernos; 11 - Pedra da Baleia.

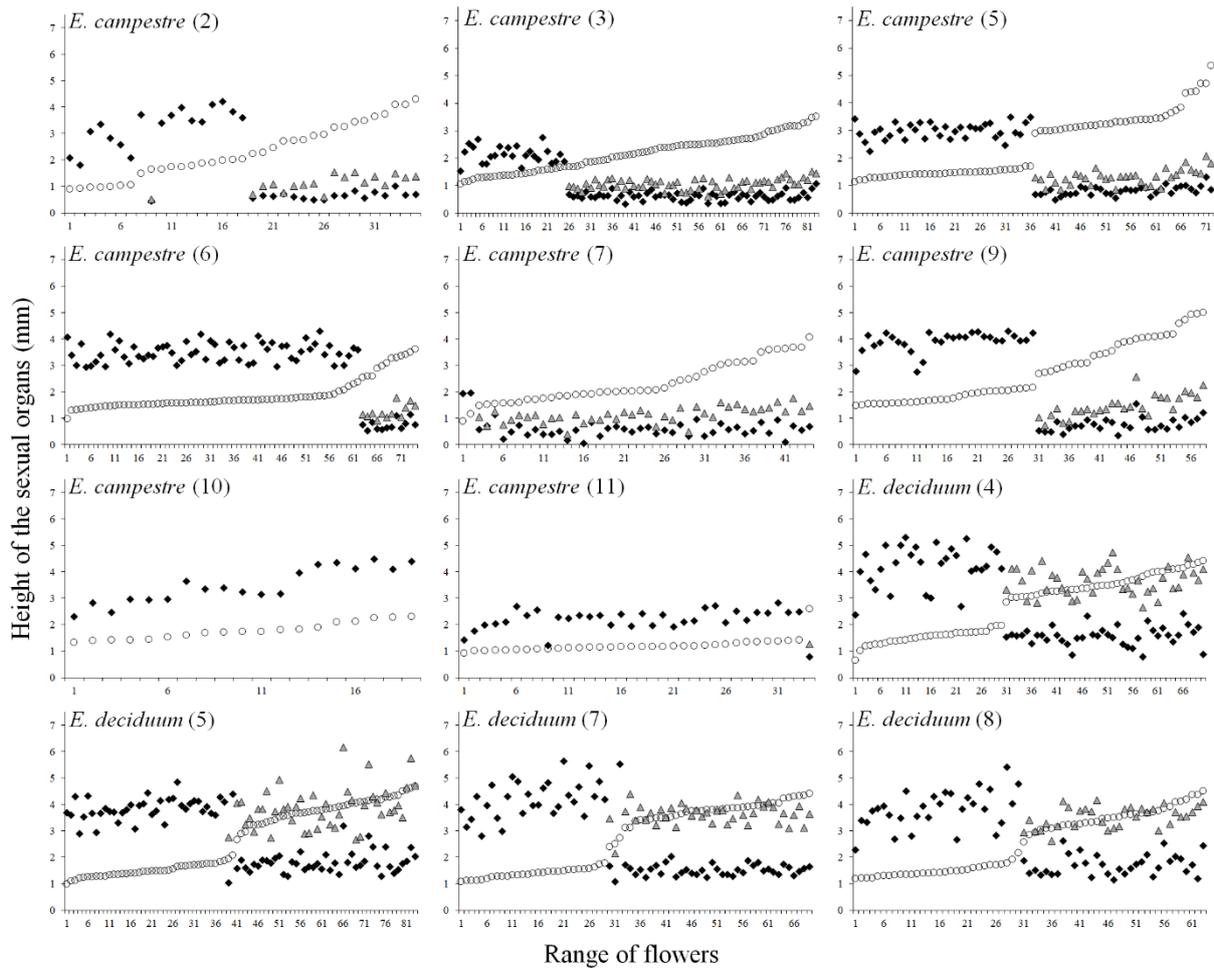


FIGURE 4. Variation in anthers (◆: S-morph anthers and lower L-morph anthers; ▲: upper L-morph anthers) and stigmas height (○) in flowers of different populations of *Erythroxylum campestre* and *E. deciduum* in the Cerrado of Central Brazil. Flowers are arranged in order of increasing stigmas height to illustrate the reciprocity between corresponding sexual organs. Sampled area of each population are showed in parenthesis.

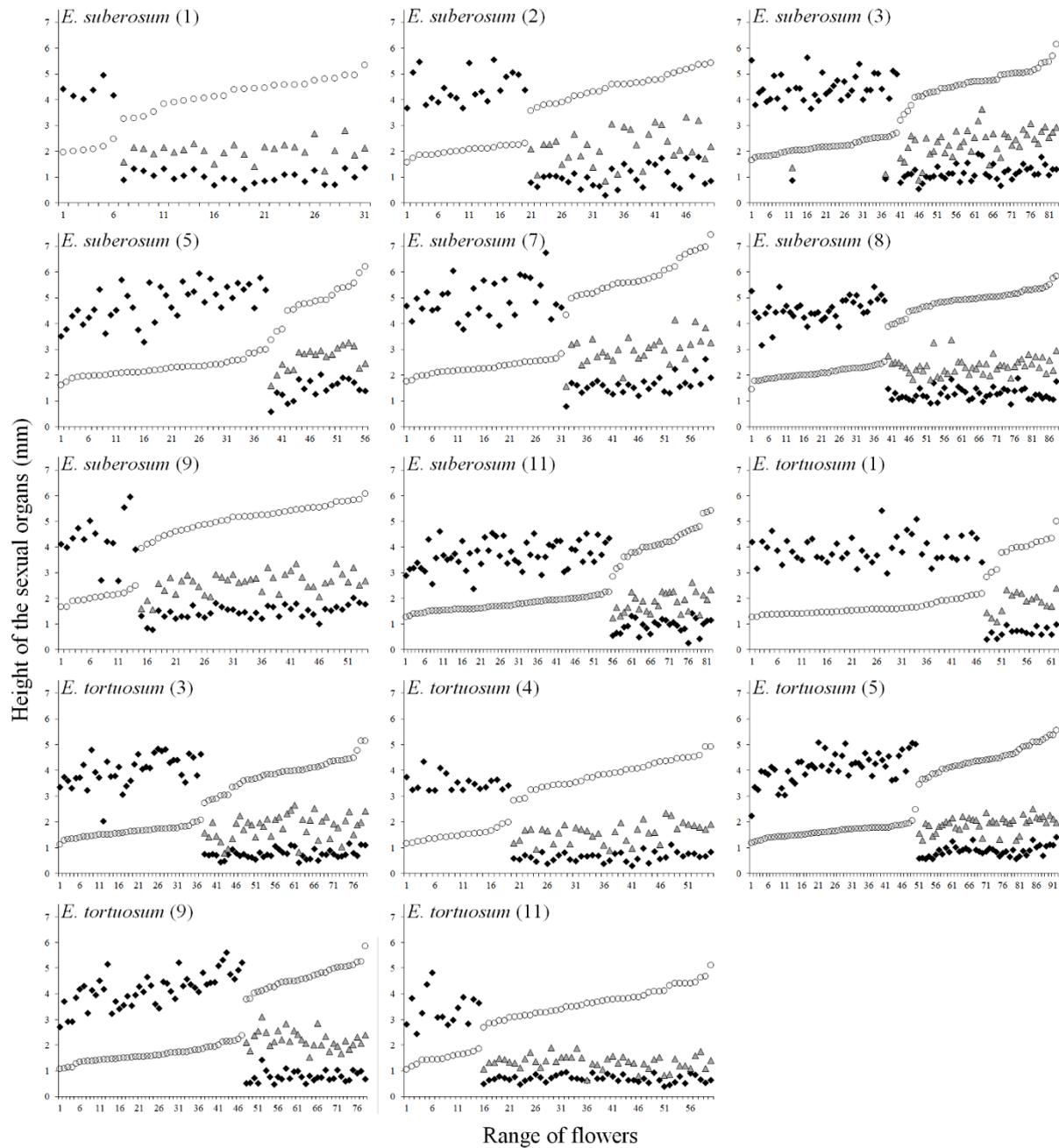


FIGURE 5. Variation in anthers (◆: S-morph anthers and lower L-morph anthers; ▲: upper L-morph anthers) and stigmas height (○) in flowers of different populations of *Erythroxylum suberosum* and *E. tortuosum* in the Cerrado of Central Brazil. Flowers are arranged in order of increasing stigmas height to illustrate the reciprocity between corresponding sexual organs. Sampled area of each population are showed in parenthesis.

TABLE 1. Morph ratio and chi-square test to identify departure from isoplethy (1:1) in populations of four *Erythroxylum* species in the Cerrado of Central Brazil.

Species/Locality	Number of plants (S:L-morph)	df	χ^2	P	Characterization of populations
<i>Erythroxylum campestre</i>					
2	40 (21:19)	1	0.03	0.874	Isoplethy
3	56 (17:39)	1	7.88	< 0.001	Anisoplethy (\uparrow L)
5	39 (21:18)	1	0.10	0.749	Isoplethy
6	39 (32:7)	1	14.77	< 0.001	Anisoplethy (\uparrow S)
7	37 (1:36)	1	31.24	< 0.001	Anisoplethy (\uparrow L)
9	39 (19:20)	1	0.00	1.000	Isoplethy
10	43 (43:0)	1	41.02	< 0.001	Monomorphic
11	41 (39:2)	1	31.61	< 0.001	Anisoplethy (\uparrow S)
<i>Erythroxylum deciduum</i>					
4	41 (18:23)	1	0.39	0.532	Isoplethy
5	40 (18:22)	1	0.23	0.635	Isoplethy
7	39 (15:24)	1	1.64	0.200	Isoplethy
8	34 (13:21)	1	1.44	0.230	Isoplethy
<i>Erythroxylum suberosum</i>					
1	32 (12:20)	1	1.53	0.216	Isoplethy
2	34 (14:20)	1	0.74	0.391	Isoplethy
3	48 (22:26)	1	0.19	0.665	Isoplethy
5	40 (26:14)	1	3.03	0.082	Isoplethy
7	42 (21:21)	1	0.00	1.000	Isoplethy
8	35 (16:19)	1	0.11	0.735	Isoplethy
9	30 (7:23)	1	7.50	0.006	Anisoplethy (\uparrow L)
11	72 (40:32)	1	0.68	0.409	Isoplethy
<i>Erythroxylum tortuosum</i>					
1	42 (27:15)	1	2.88	0.090	Isoplethy
3	49 (23:26)	1	0.08	0.775	Isoplethy
4	31 (9:22)	1	4.65	0.031	Anisoplethy (\uparrow L)
5	39 (22:17)	1	0.41	0.522	Isoplethy
9	37 (22:15)	1	0.97	0.324	Isoplethy
11	42 (19:23)	1	0.21	0.643	Isoplethy

TABLE 2. Flower morphometrics of four *Erythroxyllum* species: sample size for the two floral morphs, mean (\pm variance) of the height of each organ type, average organ height across all organ types, mean (\pm variance) of upper and lower anthers in the L-morph, and mean (\pm standard deviation) of anther-stigma separation (using the upper anther in the case of L-flowers) in the two floral morphs. The morphometrics values are expressed in millimeters.

Species/Locality	n L-morph	n S-morph	High stigmas S	High anthers A	Low stigmas s	Low anthers a	Average organ height	Two sets of low anthers in L-morph		Stigma-anther separation	
								Upper anthers aA	Lower anthers aa	S-morph (s-A)	L-morph (S-aA)
<i>Erythroxyllum campestre</i>											
2	18	17	3.11 (0.52)	3.25 (0.54)	1.47 (0.20)	0.88 (0.11)	2.18	1.11 (0.10)	0.64 (0.02)	- 1.78 (0.45)	2.00 (0.53)
3	58	25	2.49 (0.22)	2.13 (0.10)	1.40 (0.03)	0.84 (0.08)	1.72	1.06 (0.04)	0.62 (0.02)	- 0.73 (0.36)	1.43 (0.43)
5	36	36	3.50 (0.34)	2.99 (0.09)	1.44 (0.02)	1.06 (0.12)	2.24	1.31 (0.08)	0.81 (0.03)	- 1.55 (0.29)	2.19 (0.45)
6	12	62	3.10 (0.14)	3.51 (0.13)	1.65 (0.05)	1.01 (0.12)	2.31	1.25 (0.07)	0.76 (0.04)	- 1.86 (0.42)	1.84 (0.31)
7	42	2	2.40 (0.57)	1.95 (0.01)	1.02 (0.04)	0.84 (0.15)	1.55	1.13 (0.09)	0.55 (0.05)	- 0.93 (0.19)	1.27 (0.61)
9	28	30	3.73 (0.51)	3.90 (0.16)	1.79 (0.05)	1.12 (0.25)	2.63	1.47 (0.18)	0.76 (0.07)	- 2.11 (0.35)	2.26 (0.48)
10	0	19	-	3.47 (0.45)	1.77 (0.10)	-	2.62	-	-	- 1.71 (0.41)	-
11	1	33	2.61	2.23 (0.12)	1.17 (0.02)	1.02 (0.11)	1.76	1.26	0.78	- 1.05 (0.30)	1.35
Average			2.99 (0.38)	2.93 (0.20)	1.46 (0.06)	0.97 (0.13)	2.13	1.23 (0.09)	0.70 (0.04)	- 1.57 (0.57)	1.73 (0.63)
<i>Erythroxyllum deciduum</i>											
4	40	30	3.58 (0.18)	4.21 (0.61)	1.51 (0.08)	2.61 (1.27)	2.98	3.64 (0.27)	1.58 (0.13)	- 2.70 (0.73)	- 0.06 (0.64)
5	44	39	3.77 (0.30)	3.85 (0.17)	1.49 (0.06)	2.84 (1.47)	2.98	3.87 (0.62)	1.80 (0.16)	- 2.36 (0.38)	- 0.11 (0.78)
7	39	30	3.73 (0.19)	4.22 (0.53)	1.43 (0.09)	2.57 (1.21)	2.99	3.61 (0.17)	1.52 (0.04)	- 2.78 (0.62)	0.12 (0.53)
8	33	30	3.54 (0.21)	3.80 (0.51)	1.49 (0.05)	2.62 (0.99)	2.86	3.52 (0.17)	1.72 (0.16)	- 2.32 (0.64)	0.01 (0.46)
Average			3.66 (0.22)	4.02 (0.46)	1.48 (0.07)	2.66 (1.24)	2.95	3.66 (0.31)	1.66 (0.12)	- 2.53 (0.62)	- 0.01 (0.63)
<i>Erythroxyllum suberosum</i>											
1	25	6	4.29 (0.31)	4.35 (0.11)	2.12 (0.03)	1.51 (0.35)	3.07	2.03 (0.12)	1.00 (0.06)	- 2.22 (0.38)	2.26 (0.60)
2	30	20	4.53 (0.29)	4.47 (0.37)	2.03 (0.04)	1.59 (0.66)	3.15	2.18 (0.46)	1.00 (0.16)	- 2.44 (0.58)	2.36 (0.73)
3	45	38	4.57 (0.58)	4.48 (0.26)	2.16 (0.07)	1.73 (0.54)	3.23	2.31 (0.32)	1.16 (0.09)	- 2.31 (0.52)	2.26 (0.62)
5	18	38	4.88 (0.56)	4.81 (0.51)	2.26 (0.10)	2.06 (0.54)	3.50	2.65 (0.21)	1.46 (0.15)	- 2.56 (0.59)	2.23 (0.61)
7	29	31	5.83 (0.53)	4.95 (0.52)	2.28 (0.06)	2.30 (0.70)	3.84	2.99 (0.32)	1.61 (0.12)	- 2.67 (0.70)	2.84 (0.64)
8	49	39	4.90 (0.19)	4.54 (0.22)	2.07 (0.05)	1.82 (0.38)	3.33	2.36 (0.11)	1.27 (0.06)	- 2.47 (0.45)	2.53 (0.52)
9	40	14	5.14 (0.27)	4.30 (0.81)	2.05 (0.05)	2.04 (0.45)	3.38	2.60 (0.18)	1.47 (0.07)	- 2.25 (0.89)	2.53 (0.46)
11	27	55	4.19 (0.41)	3.71 (0.29)	1.75 (0.06)	1.38 (0.34)	2.76	1.85 (0.15)	0.91 (0.08)	- 1.96 (0.51)	2.34 (0.57)
Average			4.79 (0.39)	4.45 (0.39)	2.09 (0.06)	1.80 (0.50)	3.28	2.37 (0.23)	1.24 (0.10)	- 2.35 (0.62)	2.43 (0.61)
<i>Erythroxyllum tortuosum</i>											
1	15	47	3.91 (0.32)	3.91 (0.27)	1.61 (0.06)	1.27 (0.44)	2.67	1.85 (0.16)	0.69 (0.03)	- 2.30 (0.56)	2.06 (0.39)
3	42	37	3.87 (0.34)	3.99 (0.36)	1.61 (0.04)	1.28 (0.40)	2.69	1.80 (0.21)	0.76 (0.03)	- 2.36 (0.53)	2.07 (0.59)
4	36	19	3.88 (0.30)	3.51 (0.10)	1.49 (0.05)	1.13 (0.31)	2.50	1.60 (0.13)	0.65 (0.03)	- 2.01 (0.43)	2.28 (0.52)
5	42	50	4.48 (0.27)	4.12 (0.33)	1.64 (0.05)	1.40 (0.34)	2.91	1.92 (0.09)	0.88 (0.04)	- 2.48 (0.47)	2.55 (0.47)
9	31	47	4.64 (0.22)	4.18 (0.44)	1.64 (0.10)	1.50 (0.60)	2.99	2.21 (0.13)	0.79 (0.05)	- 2.54 (0.48)	2.43 (0.64)
11	45	15	3.70 (0.31)	3.40 (0.42)	1.49 (0.05)	1.01 (0.15)	2.40	1.34 (0.07)	0.69 (0.02)	- 1.91 (0.65)	2.36 (0.65)
Average			4.08 (0.29)	3.85 (0.32)	1.58 (0.06)	1.27 (0.37)	2.69	1.79 (0.13)	0.74 (0.03)	- 2.36 (0.54)	2.32 (0.59)

TABLE 3. Results of the analysis of variance for the comparisons between floral morphs and populations of stigma height, anther height and herkogamy for the *Erythroxyllum* species studied. High anther height corresponds to the comparison between S-morph anthers and upper L-morph anthers. Low anther height corresponds to the comparison between S-morph anthers and lower L-morph anthers.

Source of variation	Stigma height			High anther height		Low anther height		Stigma-anther separation	
	df	F	P	F	P	F	P	F	P
<i>Erythroxyllum campestre</i>									
Morph	1	589.7	< 0.001	1644.6	< 0.001	3310.7	< 0.001	11.4	< 0.001
Population	4	26.3	< 0.001	47.3	< 0.001	45.1	< 0.001	46.8	< 0.001
Morph * Population	4	8.8	< 0.001	22.4	< 0.001	38.5	< 0.001	5.3	< 0.001
<i>Erythroxyllum deciduum</i>									
Morph	1	1084.7	< 0.001	14.9	< 0.001	909.7	< 0.001	818.9	< 0.001
Population	3	0.5	0.717	1.3	0.271	0.3	0.835	2.6	0.049
Morph * Population	3	0.4	0.762	2.6	0.051	5.8	< 0.001	4.1	0.006
<i>Erythroxyllum suberosum</i>									
Morph	1	2196.3	< 0.001	903.6	< 0.001	2941.0	< 0.001	2.6	0.254
Population	6	19.8	< 0.001	22.0	< 0.001	22.7	< 0.001	5.7	< 0.001
Morph * Population	6	7.8	< 0.001	1.0	0.424	2.5	0.022	1.8	0.087
<i>Erythroxyllum tortuosum</i>									
Morph	1	3231.3	< 0.001	2087.7	< 0.001	5996.7	< 0.001	2.0	0.287
Population	5	9.9	< 0.001	15.2	< 0.001	7.1	< 0.001	3.6	0.003
Morph * Population	5	8.5	< 0.001	1.4	0.221	5.4	< 0.001	4.9	< 0.001

TABLE 4. Estimates of inaccuracy of reciprocity in species and populations of *Erythroxyllum* in the Cerrado of Central Brazil (standardized inaccuracy in parentheses). The values of inaccuracy were standardized by the average² height of all organ types of the population. Total inaccuracy for each population (column 4) is the sum of the inaccuracy values of high and low organs (columns 2 and 3). In columns 5 and 6 are shown inaccuracy (absolute value in units of millimeters² and percentage standardized) of the low organs (S-stigmas and L-anthers) considering separately the upper (aA) and lower (aa) L-morph anthers.

Species/Locality	Inaccuracy by organ type		Total inaccuracy	Inaccuracy of the low organs considering the different height of anthers in L-morph	
	High	Low		aA-s	aa-s
<i>Erythroxyllum campestre</i>					
2	1.08 (22.81%)	0.66 (14.04%)	1.74 (36.85%)	0.43 (9.08%)	0.90 (19.01%)
3	0.44 (15.07%)	0.42 (14.35%)	0.87 (29.42%)	0.18 (6.18%)	0.66 (22.51%)
5	0.69 (13.64%)	0.28 (5.49%)	0.96 (19.13%)	0.12 (2.29%)	0.44 (8.68%)
6	0.44 (8.24%)	0.58 (10.93%)	1.03 (19.17%)	0.28 (5.23%)	0.89 (16.61%)
7	0.77 (32.00%)	0.22 (9.16%)	0.99 (41.16%)	0.14 (5.67%)	0.30 (12.62%)
9	0.70 (10.02%)	0.75 (10.86%)	1.45 (20.89%)	0.33 (4.82%)	1.17 (16.90%)
11	0.26 (8.55%)	0.15 (4.93%)	0.42 (13.48%)	0.02 (0.70%)	0.17 (5.52%)
Average	0.63 (15.76%)	0.44 (9.96%)	1.07 (25.73%)	0.21 (4.85%)	0.65 (14.55%)
<i>Erythroxyllum deciduum</i>					
4	1.20 (13.49%)	2.56 (28.88%)	3.76 (42.37%)	4.89 (55.12%)	0.21 (2.40%)
5	0.47 (5.32%)	3.35 (37.62%)	3.82 (42.94%)	6.37 (71.52%)	0.32 (3.54%)
7	0.96 (10.74%)	2.58 (28.94%)	3.54 (39.67%)	4.99 (56.00%)	0.14 (1.59%)
8	0.79 (9.70%)	2.32 (28.36%)	3.12 (38.07%)	4.36 (53.28%)	0.26 (3.20%)
Average	0.86 (9.81%)	2.70 (30.95%)	3.56 (40.76%)	5.15 (58.98%)	0.23 (2.68%)
<i>Erythroxyllum suberosum</i>					
1	0.42 (4.48%)	0.76 (8.05%)	1.18 (12.53%)	0.16 (1.74%)	1.34 (14.28%)
2	0.67 (6.71%)	0.89 (8.93%)	1.56 (15.64%)	0.52 (5.23%)	1.25 (12.60%)
3	0.85 (8.08%)	0.80 (7.61%)	1.64 (15.69%)	0.42 (4.00%)	1.17 (11.20%)
5	1.07 (8.70%)	0.68 (5.55%)	1.75 (14.25%)	0.47 (3.80%)	0.89 (7.22%)
7	1.81 (12.30%)	0.76 (5.15%)	2.57 (17.46%)	0.88 (5.96%)	0.63 (4.28%)
8	0.54 (4.89%)	0.50 (4.50%)	1.04 (9.39%)	0.24 (2.20%)	0.75 (6.75%)
9	1.78 (15.62%)	0.50 (4.39%)	2.29 (20.01%)	0.54 (4.74%)	0.46 (4.01%)
11	0.93 (12.23%)	0.53 (7.02%)	1.46 (19.25%)	0.22 (2.84%)	0.85 (11.15%)
Average	1.01 (9.13%)	0.68 (6.40%)	1.69 (15.53%)	0.43 (3.81%)	0.92 (8.94%)
<i>Erythroxyllum tortuosum</i>					
1	0.59 (8.20%)	0.61 (8.53%)	1.20 (16.73%)	0.28 (3.87%)	0.93 (12.97%)
3	0.71 (9.80%)	0.55 (7.65%)	1.26 (17.45%)	0.29 (4.04%)	0.81 (11.21%)
4	0.54 (8.68%)	0.50 (7.94%)	1.04 (16.61%)	0.20 (3.13%)	0.79 (12.68%)
5	0.73 (8.61%)	0.45 (5.32%)	1.18 (13.93%)	0.23 (2.67%)	0.67 (7.91%)
9	0.86 (9.64%)	0.72 (8.04%)	1.58 (17.68%)	0.55 (6.11%)	0.88 (9.81%)
11	0.82 (14.24%)	0.43 (7.40%)	1.25 (21.64%)	0.14 (2.50%)	0.71 (12.28%)
Average	0.71 (9.86%)	0.54 (7.48%)	1.25 (17.34%)	0.28 (3.72%)	0.80 (11.14%)

TABLE 5. Mean \pm standard deviation of pollen size and pollen production per anther in S- and L-flower of the *Erythroxylum* species studied in the Cerrado of Central Brazil, including the results of the analysis of variance to identify differences among anthers types. Number of pollen grains measured, and flowers used to analyze pollen production are in parentheses. The values with different superscript letters were significantly different from each other at the 0.05 level in post-hoc tests.

Pollen characteristics/Species	Anthers types			df	F	P
	S-morph	L-morph (upper anther)	L-morph (lower anther)			
Pollen size (μm)						
<i>Erythroxylum campestre</i>	39.85 \pm 3.60 (290) ^a	32.99 \pm 2.35 (140) ^b	33.64 \pm 2.82 (150) ^b	2	42.1	< 0.001
<i>Erythroxylum deciduum</i>	21.31 \pm 2.56 (100) ^a	18.57 \pm 2.51 (100) ^b	18.08 \pm 2.94 (99) ^b	2	7.1	< 0.001
<i>Erythroxylum suberosum</i>	26.17 \pm 2.29 (100) ^a	24.60 \pm 3.49 (100) ^a	21.87 \pm 2.22 (100) ^b	2	47.1	< 0.001
<i>Erythroxylum tortuosum</i>	31.46 \pm 2.18 (146) ^a	24.90 \pm 1.75 (100) ^b	24.96 \pm 1.40 (100) ^b	2	74.8	< 0.001
Pollen production						
<i>Erythroxylum campestre</i>	109 \pm 41 (10) ^a	225 \pm 102 (10) ^b	306 \pm 155 (10) ^c	2	10.8	< 0.001
<i>Erythroxylum deciduum</i>	361 \pm 144 (10) ^a	530 \pm 279 (10) ^a	864 \pm 392 (10) ^b	2	12.7	< 0.001
<i>Erythroxylum suberosum</i>	373 \pm 121 (10) ^a	507 \pm 228 (9) ^a	676 \pm 102 (9) ^b	2	7.9	< 0.001
<i>Erythroxylum tortuosum</i>	399 \pm 99 (10) ^a	635 \pm 147 (10) ^b	836 \pm 171 (10) ^c	2	22.6	< 0.001

APPENDIX S1. Locations of the areas under study. DF= Federal District; GO= Goiás; MG= Minas Gerais.

Region and name of areas	Area code	Coordinates
Brasília (DF) - Parque Nacional de Brasília	1	15°43'S, 47°57'W
Brasília (DF) - APA do Paranoá	2	15°45'S, 47°51'W
Brasília (DF) - RECOR	3	15°56'S, 47°55'W
Catalão (GO) - Pasto do Pedrinho	4	18°09'S, 47°56'W
Catalão (GO) - Fazenda Pé do Morro	5	18°06'S, 47°59'W
Catalão (GO) - Pires Belo	6	17°52'S, 47°42'W
Caldas Novas (GO) - PESCAN	7	17°46'S, 48°39'W
Uberlândia (MG) - Clube Caça & Pesca Itororó	8	19°00'S, 48°18'W
Uberlândia (MG) - Estação Ecológica do Panga	9	19°10'S, 48°23'W
Diamantina (MG) - Ribeirão dos Infernos	10	18°16'S, 43°32'W
Diamantina (MG) - Pedra da Baleia	11	18°24'S, 43°60'W

CAPÍTULO 2

**Esterilidade masculina e sucesso reprodutivo feminino em espécies distílicas de
Erythroxylum (Erythroxylaceae): variações espaciais e temporais**

RESUMO: Mutações de esterilidade masculina em espécies hermafroditas podem representar o primeiro passo na evolução da especialização sexual. Em espécies distílicas, caso a mutação de esterilidade masculina ocorra em um morfo, tal mutação afetaria a função feminina do morfo oposto, resultando em dioícia funcional. A esterilidade masculina parece ser uma característica comum em *Erythroxylum* e sugere-se que algumas espécies tenham passado por processos de especialização sexual. Neste estudo, foi analisado o nível de esterilidade masculina e o sucesso reprodutivo entre os diferentes morfos, anos e populações de quatro espécies distílicas de *Erythroxylum*. A esterilidade masculina e o sucesso reprodutivo variaram entre populações da mesma espécie e entre anos dentro da mesma população. *Erythroxylum campestre* e *E. deciduum* exibiram esterilidade masculina morfo-tendenciosa, com flores brevistilas mais estéreis que às longistilas. Quando estas espécies tiveram variação no sucesso reprodutivo entre morfos, as plantas longistilas, normalmente, formaram mais frutos, sugerindo que a frutificação de um morfo não é influenciada pelo nível de esterilidade masculina do morfo oposto. Em *E. suberosum* e *E. tortuosum*, o nível de esterilidade masculina não diferiu entre os morfos, e o sucesso reprodutivo, raramente, variou entre indivíduos brevistilos e longistilos. Nestas circunstâncias, espera-se que a distílica seja um sistema mais estável. Os resultados deste estudo mostram evidências adicionais de que algumas espécies de *Erythroxylum* podem exibir esterilidade masculina morfo-tendenciosa sugerindo um processo de especialização sexual. Existem um contínuo de estágios evolutivos entre os sistemas sexuais e, desta forma, espera-se que a esterilidade masculina parcial nos indivíduos brevistilos de *E. campestre* e *E. deciduum* possa representar um passo inicial via ginodioícia.

PALAVRAS-CHAVE: Cerrado, dioícia, especialização sexual, ginodioícia, heterostilia, limitação polínica, sistema de incompatibilidade, sistema sexual, viabilidade polínica.

INTRODUÇÃO

A maioria das angiospermas possuem flores exclusivamente hermafroditas, com indivíduos transmitindo seus genes à progênie através de ambas as funções masculina e feminina (Renner & Ricklefs 1995; Renner 2014). No entanto, algumas espécies têm o sexo masculino e feminino separados entre os indivíduos (dioícia), e praticamente todas as variações entre estes sistemas sexuais são encontradas (Sabath *et al.* 2016). Devido ao alto grau de variabilidade nos sistemas sexuais, as angiospermas fornecem um grupo ideal para realizar análises evolutivas comparativas para compreender a evolução dos sistemas sexuais (Sabath *et*

al. 2016). A evolução da especialização sexual é iniciada pelo aparecimento de uma mutação que resulta na esterilidade parcial ou total de uma função sexual em alguns indivíduos da população, seguidas de pressões seletivas subsequentes (Schultz 1994; Domínguez 1995). Geralmente, a esterilidade masculina é o primeiro passo na evolução da unissexualidade floral, exercendo um papel importante na evolução dos sistemas sexuais, como a ginodioicia e a dioicia (Schultz 1994; Charlesworth 1999; Cuevas *et al.* 2005). Uma das principais pressões que favorece a especialização sexual inclui os benefícios de reduzir a autofecundação, que por sua vez, deve diminuir a depressão endogâmica (Charlesworth & Charlesworth 1978; Bawa 1980; Thomson & Brunet 1990). Uma alocação diferencial de recursos para a função masculina ou feminina também pode favorecer a especialização sexual (Thomson & Brunet 1990). Esta condição é expressa principalmente quando os recursos são limitados e existem processos sexualmente selecionados, como competição entre machos e seleção gametofítica (Arnold 1994; Willson 1994). Neste sentido, a alocação de recursos para um traço de história de vida reduz o investimento em outro traço (Barrett 2002).

A evolução de várias formas de especialização sexual, incluindo ginodioicia e dioicia, é documentada em vários grupos heterostílicos (e.g., *Cordia* L. (Boraginaceae), Opler *et al.* 1975; Lloyd 1979; *Coussarea* Aubl. e *Chassalia* Comm. ex Poir. (Rubiaceae), Beach & Bawa 1980; Paillet *et al.* 1998; *Nymphoides* Hill (Menyanthaceae), Barrett 1980). A heterostilia é um polimorfismo floral em que as populações apresentam dois (distilia) ou três (tristilia) morfos hermafroditas (Barrett & Shore 2008). A distilia é comumente controlada por um modelo simples de herança mendeliana, de modo que um alelo dominante (*S*) e recessivo (*s*) segrega como um único locus governando a manifestação do morfo longistila (*ss*) e brevistila (*Ss*). No entanto, estudos primeiramente com *Primula* L. (Primulaceae) mostraram que a simples herança mendeliana é sustentada por uma arquitetura genética complexa controlada por um supergene composto por pelo menos três locos, cada um com dois alelos, sendo um completamente dominante sobre o outro (Ernst 1955; Ganders 1979b; Barrett & Shore 2008). A maioria das plantas distílicas são caracterizadas por apresentar duas características controladas pelo supergene que promovem cruzamentos intermorfos: hercogamia recíproca e incompatibilidade heteromórfico (Webb & Lloyd 1986; Barrett & Richards 1990). Apesar das evidências comparativas e morfológicas para a evolução da especialização sexual em espécies distílicas, os mecanismos seletivos responsáveis pela transição não estão bem estabelecidos. O fato das plantas distílicas, geralmente, apresentarem um sistema de incompatibilidade, faz com

que a seleção contra a endogamia ou a autofecundação muitas vezes não seja colocada como uma possível “força motriz” para a evolução da especialização sexual (Bawa 1980).

Modelos teóricos e estudos empíricos enfatizam o papel da transferência de pólen altamente assimétrica entre os morfos e, conseqüentemente, da atuação de polinizadores, como a principal pressão seletiva que conduz a evolução da dioicidia em espécies distílicas (Ornduff 1975; Charlesworth & Charlesworth 1979; Lloyd 1979; Beach & Bawa 1980; Muenchow & Grebus 1989; Barrett 1992; Pailler *et al.* 1998). De acordo com esta hipótese, a pressão seletiva que gera a especialização sexual depende de fatores externos, ou seja, perda dos polinizadores mais eficientes. Embora estudos mostrem fluxo de pólen assimétrico ou variação da limitação polínica entre morfos impulsionados por polinizadores (Lau & Bosque 2003; García-Robledo 2008), nenhum provou uma relação causal entre estes aspectos e a evolução da dioicidia (Beach & Bawa 1980; Muenchow & Grebus 1989; Rosas & Domínguez 2009). Fatores genéticos intrínsecos também têm potencial de afetar a especialização sexual em espécies distílicas. As mutações de esterilidade podem ser expressas diferentemente entre os morfos, e levar um morfo a contribuir mais com a função masculina ou feminina do que o outro em consequência de um conflito genético de interesse sobre a alocação de recursos para o pólen vs. óvulos (Schultz 1994; Domínguez *et al.* 1997; Pailler *et al.* 1998; Del-Carlo & Buzato 2006). Assim, além dos fatores ecológicos, outras forças seletivas podem operar na evolução da especialização sexual em plantas distílicas, que são impulsionadas por interações genéticas.

Em *Erythroxylum* P. Browne (Erythroxylaceae), as espécies apresentam uma variedade de estratégias reprodutivas, como heterostilia (Ganders 1979a; Barros 1998; Pailler *et al.* 1998), ginodioicidia (Domínguez *et al.* 1997; Avila-Sakar & Domínguez 2000), dioicidia (Bawa & Opler 1975) e agamospermia (Berry *et al.* 1991), fazendo com que este grupo de plantas se torne um excelente modelo para estudos comparativos dos sistemas de reprodução. *Erythroxylum havanense* Jacq. têm sido uma espécie bem estudada na região do México. Inicialmente, as populações desta espécie foram consideradas parcialmente ginodióicas já que apresentaram esterilidade masculina morfo-tendenciosa, com indivíduos brevistilos estéreis ou parcialmente estéreis (Cuevas *et al.* 2005; Rosas *et al.* 2005). As plantas brevistilas produziram, em média, 51% menos pólen viável do que às longistilas (Cuevas *et al.* 2005). Tratando-se de plantas heterostílicas que, geralmente, apresentam sistema de incompatibilidade heteromórfico, a esterilidade masculina morfo-tendenciosa pode levar a uma taxa de frutificação diferencial entre os morfos florais e ter fortes implicações para uma possível evolução para a dioicidia. Em *E. havanense*, os resultados apoiam a interpretação de que a seleção natural está favorecendo a

evolução de plantas brevistilas com esterilidade masculina completa (Rosas & Domínguez 2009). Como a frutificação das plantas longistilas desta espécie depende do pólen produzido pelas brevistilas, a invasão de plantas brevistilas fêmeas resultaria na evolução da dioiccia funcional (Rosas & Domínguez 2009).

Estudos indicam que algumas espécies de *Erythroxylum* tenham passado por processos de especialização sexual e que a esterilidade masculina seja um fenômeno generalizado dentro do gênero (Domínguez *et al.* 1997; Avila-Sakar & Domínguez 2000; Del-Carlo & Buzato 2006; Silva *et al.* 2016). Entretanto, poucas espécies foram estudadas, sobretudo, no Brasil que é um dos principais centros de diversidade e endemismo do gênero (Plowman & Hensold 2004). Neste sentido, o principal objetivo deste estudo foi investigar a existência de esterilidade masculina e o sucesso reprodutivo feminino em diferentes anos e populações de quatro espécies distílicas de *Erythroxylum* do Brasil Central. As perguntas específicas são: (1) as espécies exibem esterilidade masculina a partir da diferença da viabilidade dos grãos de pólen entre flores brevistilas e longistilas? (2) existe diferença no sucesso reprodutivo feminino entre os indivíduos brevistilos e longistilos? (3) há variações entre populações (variação espacial) e anos (variação temporal), quanto ao nível e padrão de esterilidade masculina e sucesso reprodutivo dos morfos florais? (4) as populações exibem sistema de incompatibilidade auto e intramorfo? (5) as populações têm limitação polínica e o morfo floral está relacionado com o nível de limitação de pólen? Estas questões são de grande importância, pois suas respostas podem permitir uma melhor compreensão dos mecanismos seletivos responsáveis pela evolução dos sistemas de reprodução em espécies de *Erythroxylum*.

METODOLOGIA

Espécies e áreas estudadas - Foram estudadas 23 populações de quatro espécies de *Erythroxylum* (Fig. 1), sendo elas: *E. campestre* A.St.-Hil. (cinco populações), *E. deciduum* A.St.-Hil. (quatro populações), *E. suberosum* A.St.-Hil. (oito populações) e *E. tortuosum* Mart. (seis populações). As espécies florescem entre agosto e novembro (Matias R. dados do terceiro capítulo), e exibem flores, morfologicamente, distílicas, sendo que em flores longistilas as 10 anteras se posicionam em dois níveis de altura (cada nível com cinco anteras) e em flores brevistilas todas as anteras mantêm-se em um só nível (Matias R. dados do primeiro capítulo). O ovário é súpero, sendo composto por três carpelos sincárpicos com três lóculos, dois dos quais estão vazios e o terceiro com apenas um óvulo. O único óvulo é funcional nas quatro

espécies, semelhante ao encontrado em outras *Erythroxylum* (Domínguez *et al.* 1997; Loiola *et al.* 2007). As flores das espécies estudadas produzem uma pequena quantidade de néctar e são visitadas por abelhas, vespas, borboletas e moscas, o que indica um sistema de polinização generalista (Barros 1998; Matias R. dados do terceiro capítulo). Os frutos são do tipo drupa, vermelhos quando maduros e a frutificação das espécies ocorrem entre setembro e fevereiro (Matias R. dados do terceiro capítulo). As espécies ocorrem em alta densidade no Cerrado do Brasil Central e as populações estudadas estão distribuídas em 10 áreas nos estados de Goiás e Minas Gerais, e no Distrito Federal (Fig. 1). Detalhes das áreas (região, nome e coordenadas) estão incluídas na Tabela S1.

Esterilidade masculina - O nível de esterilidade masculina dos diferentes morfos florais foi analisado em todas as 23 populações das quatro espécies de *Erythroxylum* encontradas nas 10 áreas de estudo (Fig. 1). Amostragens foram realizadas no ano de 2015 em todas as populações, sendo também coletadas amostras no ano de 2016 e 2017 nas populações da área cinco (Fig. 1) com a finalidade de analisar variações temporais. Em cada população (ou ano amostrado), foram coletados botões florais em pré-antese de cinco a 33 indivíduos por morfo, sendo coletado entre um e dois botões por indivíduo. Desta forma, foram coletados entre oito a 46 botões por morfo, e um total de 34 a 80 botões em cada população (ano). O tamanho da amostragem foi determinado pela quantidade de indivíduos longistilos e brevistilos florescendo em cada área para cada espécie. Após a coleta em campo, os botões florais foram armazenados em álcool 70% até serem analisados em laboratório.

A viabilidade dos grãos de pólen foi estimada utilizando o método indireto de coloração citoplasmática com carmim acético, metodologia também utilizada no estudo de Del-Carlo e Buzato (2006) em *E. suberosum*. Em laboratório, todas as anteras de cada botão floral foram dissecadas e maceradas. Os grãos de pólen dos dois níveis de altura das anteras longistilas foram analisados conjuntamente após a verificação de que não há diferenças na esterilidade masculina entre os dois verticilos dentro da mesma flor (Fig. S1). A proporção de grãos de pólen viáveis foi estimada pela contagem de 200 grãos por botão em microscópio de luz, sendo esta medida usada como indicador de esterilidade masculina. Foram considerados grãos de pólen viáveis (férteis) aqueles esféricos e intensamente corados com carmim acético; grãos de pólen inviáveis (estéreis) aqueles amorfos e não corados.

Sucesso reprodutivo feminino - A taxa de frutificação natural foi utilizada como uma medida de sucesso reprodutivo feminino, sendo analisada em 13 populações das quatro espécies

estudadas no ano de 2015 (três populações de *E. campestre*; quatro de *E. deciduum*; quatro de *E. suberosum*; duas de *E. tortuosum*; ver pontos preenchidos na Fig. 1). Para averiguar variações temporais, dados também foram coletados nos anos de 2016 e 2017 para as quatro espécies, porém apenas na área cinco (Fig. 1). Para isso, foram selecionados de 10 a 36 indivíduos por população (ano), sendo que um ramo florido foi marcado, aleatoriamente, para cada indivíduo e contado o número total de flores disponíveis. O morfo floral dos indivíduos foi identificado previamente e a quantidade de flores por ramo variou entre três a 144, sendo as flores deixadas expostas à ação dos polinizadores. Ao final do período de floração de cada espécie, e antes que os frutos estivessem totalmente maduros, evitando assim a perda de frutos por dispersão, contou-se a quantidade de frutos formados, naturalmente, em cada ramo do indivíduo marcado. A partir do resultado do número de frutos formados/número de flores disponíveis, foi estabelecida a taxa de frutificação de cada indivíduo.

Sistema de acasalamento - O sistema de acasalamento das quatro espécies foi estudado nas populações da área cinco (Fig. 1) em 2016, sendo-o definido por meio de polinizações manuais onde avaliou-se o crescimento dos tubos polínicos e a formação de frutos. As polinizações para análise dos tubos polínicos foram realizadas com intuito de investigar se as populações e morfos apresentam reação de incompatibilidade através da observação de inibição do crescimento dos tubos polínicos. Três tipos de tratamentos foram realizados: (1) autopolinização manual: flores foram polinizadas utilizando grãos de pólen da própria flor; (2) polinização cruzada intramorfo: flores de um morfo receberam grãos de pólen de flores do mesmo morfo, mas de indivíduos diferentes; e (3) polinização cruzada intermorfo: flores de um morfo receberam grãos de pólen de flores de outro morfo. Foram utilizadas entre cinco e 13 flores por tratamento em cada morfo, distribuídas em no mínimo cinco indivíduos (total de 57 a 65 flores por espécie). Todas as flores foram, previamente, ensacadas com sacos de organza para evitar o contato com polinizadores que, possivelmente, depositariam grãos de pólen originados de doadores não identificados. As flores foram coletadas 24 horas após a polinização e fixadas em álcool 70%. O tempo de coleta dos pistilos foi determinado a partir de um estudo que demonstrou que 24 horas é o suficiente para os tubos polínicos penetrarem no ovário de *E. campestre*, *E. suberosum* e *E. tortuosum* (Barros 1998). As observações dos tubos polínicos foram feitas utilizando a técnica em microscopia de epifluorescência como descrito por Martin (1959).

Paralelamente aos testes de crescimento dos tubos polínicos, foram realizadas polinizações manuais para averiguar a formação de frutos. Para isso, foram selecionados, randomicamente, entre 16 a 19 indivíduos de cada espécie, sendo utilizadas entre 24 e 42 flores

por tratamento em cada morfo (duas a sete flores por tratamento em cada indivíduo). Além dos tratamentos de autopolinização manual, polinização cruzada intramorfo e polinização cruzada intermorfo (especificados anteriormente), outros três tratamentos foram realizados, sendo eles: (1) agamospermia: botões florais em pré-antese foram emasculados, sem receber tratamento posterior; (2) autopolinização espontânea: flores foram apenas ensacadas, sem receber qualquer tipo de tratamento; e (3) controle: flores foram apenas marcadas para avaliar a eficiência da polinização natural. Exceto para o tratamento controle, todas as flores foram, previamente, ensacadas com sacos de organza. O desenvolvimento dos frutos foi verificado após 15 dias. As espécies de *Erythroxylum* possuem apenas um óvulo desenvolvido, sendo a produção de frutos um bom indicativo para descrever o sistema de acasalamento.

Limitação polínica - Para investigar se as populações e morfos apresentam limitação polínica, foram realizados experimentos nas populações da área cinco (Fig. 1) durante o período de floração de cada espécie em 2017. Para isso, foram selecionados, aleatoriamente, entre 21 e 22 indivíduos por espécie (entre 10 e 11 indivíduos por morfo), de modo que cada indivíduo recebeu dois tipos de tratamentos (flores com pólen suplementar e natural). Foram realizados experimentos de suplementação de pólen, de forma que duas a quatro flores de cada indivíduo (23 a 43 flores por morfo) foram polinizadas, manualmente, com pólen cruzado intermorfo. Outras três a quatro flores do mesmo indivíduo (37 a 44 flores por morfo) foram selecionadas como controle e deixadas para serem polinizadas, exclusivamente, pelos visitantes. Diferenças na produção de frutos entre flores que receberam pólen suplementar e natural é interpretado como evidência de que as plantas tenham limitação polínica (Ashman *et al.* 2004).

Análise dos dados - Foi averiguado se a esterilidade masculina e o sucesso reprodutivo feminino diferiram entre morfos, populações e anos de coleta. Para isso, foram utilizados modelos lineares generalizados (GLMs) quando o sucesso reprodutivo foi a variável resposta, enquanto que para esterilidade masculina foram usados modelos lineares generalizados mistos (GLMMs) após detectar superdispersão dos dados. Geralmente, a esterilidade masculina foi avaliada em mais de uma flor por indivíduo, sendo dependentes os dados coletados dentro do mesmo indivíduo. Para resolver a falta de independência e prevenir pseudoreplicação, os indivíduos foram incluídos como fator aleatório nos GLMMs. As análises (GLMs e GLMMs) foram realizadas com o pacote *lme4*, modelado com uma distribuição binomial (fruto formado ou não formado; pólen viável ou inviável) usando a função *logit* (Bates *et al.* 2014). Para cada espécie, foi utilizado um modelo para analisar diferenças espaciais e outro para investigar diferenças temporais dentro de cada variável resposta. Para analisar diferenças espaciais, foram

usados dados do mesmo ano (2015) para as diferentes populações. Desta forma, foram testados os efeitos do morfo, população e o termo de interação influenciando na proporção de pólen viáveis e de frutos formados. Para investigar diferenças temporais, foram testados os efeitos do morfo, ano e a interação. A significância dos fatores fixos foi testada com análise de variância tipo II (pacote *car*; Fox & Weisberg 2011) e em seguida, utilizou-se a função *lsmeans* com ajuste de Tukey (pacote *emmeans*; Lenth 2017) para extrair os contrastes dentro de cada fator. Para verificar se a esterilidade masculina de um morfo tem influência no sucesso reprodutivo do morfo oposto, foram realizadas análise de regressão linear utilizando a média do sucesso reprodutivo e da esterilidade masculina da mesma população e ano estudado de todas espécies.

Para análise do sistema de acasalamento e limitação polínica de cada espécie, foram testados os efeitos do tratamento de polinização, morfo e a interação entre estes dois fatores na taxa de frutificação (número de frutos formados por indivíduo/ número de flores tratadas por indivíduo). Uma vez que não houve superdispersão dos dados do sistema de acasalamento, foram utilizados GLMs. Enquanto isso, para a limitação polínica foram usados GLMMs, de forma que plantas individuais foram incluídas como fator aleatório, uma vez que cada planta recebeu os dois tipos de tratamento de polinização (suplementação e controle) para poder assim, detectar e controlar a variabilidade potencial de cada indivíduo na variável resposta. A taxa de frutificação sempre foi modelada com uma distribuição binomial (fruto formado ou não formado) usando a função *logit*. Foi utilizada a análise de variância tipo II para testar as diferenças significativas de cada fator fixo e em seguida, utilizou-se *lsmeans* com ajuste de Tukey para obter os valores de contrastes dentro de cada fator. Além destas análises, foi calculado também o índice de autoincompatibilidade (ISI) para descrever o nível de incompatibilidade das populações. O ISI é determinado pela razão entre a proporção de frutos formados por autopolinização e por polinização cruzada intermorfo. De acordo com o índice, valores abaixo de 0.25 são considerados como autoincompatíveis e valores acima de 0.25 indicam autocompatibilidade (Bullock 1985). Todas as análises estatísticas foram realizadas com o programa R (R Core Team 2017).

RESULTADOS

Esterilidade masculina - Foram registradas diferenças significativas na viabilidade dos grãos de pólen entre as populações estudadas para as quatro espécies (Tab. 1; Fig. 2). Também foram encontradas diferenças entre os morfos florais considerando o conjunto de dados de todas as

populações de *E. campestre* e *E. deciduum* (Tab. 1), de forma que as flores brevistilas apresentaram uma maior esterilidade do que as flores longistilas (Fig. 2). Estas duas espécies também exibiram variações entre morfos florais dentro de algumas populações. A esterilidade masculina diferiu entre os morfos florais em três das cinco populações estudadas de *E. campestre* (Fig. 2), e em duas das quatro populações de *E. deciduum* (Fig. 2). Na maioria destas (exceto na área 6 de *E. campestre*), a maior esterilidade das flores brevistilas se repetiu.

Variações temporais foram encontradas em *E. campestre*, *E. suberosum* e *E. tortuosum*, mostrando diferenças significativas no nível de esterilidade masculina entre os anos de coleta nas populações da área 5 (Tab. 1; Fig. 3). Assim como registrado nos modelos de variações espaciais, diferenças na esterilidade masculina entre morfos florais foram encontradas apenas em *E. campestre* e *E. deciduum* (Tab. 1; Fig. 3). Na população de *E. campestre*, houve um padrão em que as flores brevistilas apresentaram maior esterilidade dos grãos de pólen do que as flores longistilas nos três anos estudados (Fig. 3). *Erythroxylum deciduum* também teve flores brevistilas mais estéreis quando os dados foram analisados levando em consideração todos os anos (Tab. 1), porém diferenças entre morfos não foram encontradas em todos os anos de coleta (Fig. 3). Embora o nível de esterilidade masculina de *E. suberosum* e *E. tortuosum* varie entre populações e anos, não foi encontrada nenhuma diferença entre os morfos florais.

Sucesso reprodutivo feminino - Foram detectadas diferenças significativas na taxa de frutificação natural entre as populações estudadas de *E. campestre*, *E. deciduum* e *E. suberosum* (Tab. 1; Fig. 4). Diferenças significativas no sucesso reprodutivo entre os morfos florais foram encontradas para *E. campestre* e *E. deciduum* quando os dados foram analisados para todas as populações (Tab. 1; Fig. 4). No entanto, diferenças no sucesso reprodutivo entre os morfos florais dentro da mesma população ocorreram em apenas uma das três populações de *E. campestre* (Fig. 4), e em duas das quatro populações de *E. deciduum* (Fig. 4). Nestes casos, as plantas longistilas sempre tiveram um sucesso reprodutivo maior do que as plantas brevistilas.

Em todas as espécies houve variação temporal em relação ao sucesso reprodutivo, diferindo, significativamente, entre anos (Tab. 1; Fig. 5). Diferenças entre morfos dentro do mesmo ano ocorreu em *E. campestre*, *E. deciduum* e *E. tortuosum*. Embora as populações de *E. campestre* e *E. deciduum* estudadas na área 5 tenham apresentado plantas longistilas frutificando mais do que as brevistilas no ano de 2015 (diferença já mencionada nas análises de variação espacial), esse padrão variou entre os anos. Em *E. deciduum*, variação entre morfos ocorreu apenas em 2015 (Fig. 5). Para *E. campestre*, diferenças entre morfos ocorreram em dois

anos, sendo que em 2016 as plantas brevistilas tiveram maior sucesso reprodutivo, ao contrário do registrado em 2015 (Fig. 5). As plantas brevistilas de *E. tortuosum* também frutificaram mais do que as longistilas em 2016, porém não houve diferenças entre morfos nos outros anos (Fig. 5). As variações na taxa de frutificação de um morfo não foram relacionadas com o nível de esterilidade masculina do morfo oposto dentro das populações (efeito da esterilidade masculina das plantas brevistilas sobre o sucesso reprodutivo das plantas longistilas: $R^2 = 0.031$, d.f. = 19, $P = 0.215$; vice-versa: $R^2 = -0.049$, d.f. = 19, $P = 0.793$).

Sistema de acasalamento - As análises de crescimento dos tubos polínicos sugeriram que *E. campestre* seja autocompatível, uma vez que não houve interrupção dos tubos polínicos após qualquer tratamento de polinização (Fig. 6). Em contrapartida, as outras espécies exibiram inibição dos tubos polínicos após polinização cruzada intramorfo e autopolinização, sugerindo a presença de um sistema de incompatibilidade auto e intramorfo (Fig. 6). A formação de frutos confirmou os resultados dos tubos polínicos. Os valores de frutificação após tratamentos de polinização para cada espécie e morfo estão sumarizados na Tabela 2. O tipo de tratamento teve um efeito significativo no sucesso reprodutivo de todas as espécies (Tab. 3). Em *E. campestre*, a taxa de frutificação após polinização cruzada intermorfo, cruzada intramorfo, autopolinização manual e autopolinização espontânea foram estatisticamente iguais (Tab. 2). Este resultado, juntamente com os valores do ISI de 0.89 em brevistila e 1.04 em longistila (Tab. 2) confirmam a presença de autocompatibilidade. Em *E. deciduum*, *E. suberosum* e *E. tortuosum* o tratamento de polinização intermorfo diferiu estatisticamente de todos os outros, formando uma proporção maior de frutos, e os valores de ISI foram menores que 0.25 para ambos os morfos (Tab. 2), confirmando a presença de um sistema de incompatibilidade heteromórfico. Em todas as espécies, não houve diferença significativa na proporção de frutos formados entre morfos e o termo de interação morfo x tratamento não foi significativo, indicando que as plantas brevistilas e longistilas responderam de maneira semelhante a todos os tratamentos (Tab. 3).

Limitação polínica - Os resultados dos experimentos de limitação de pólen sugerem que as populações de *E. campestre*, *E. suberosum* e *E. tortuosum* apresentam limitação polínica na área estudada (área cinco), uma vez que houve maior formação de frutos no tratamento de suplementação de pólen, independente do morfo (Tab. 3 e 4). Apenas em *E. deciduum* o tipo de tratamento não teve um efeito estatisticamente significativo no sucesso reprodutivo (Tab. 3). Em todas as espécies, o morfo e o termo de interação morfo x tratamento não teve um efeito significativo (Tab. 3), sugerindo que a presença de limitação polínica não está relacionada com um morfo floral específico.

DISCUSSÃO

Neste estudo, foram investigadas variações na esterilidade masculina e no sucesso reprodutivo feminino em diferentes anos e populações de quatro espécies, morfologicamente, distílicas de *Erythroxylum*, um grupo de plantas que apresentam transições evolutivas entre sistemas sexuais (Domínguez *et al.* 1997; Avila-Sakar & Domínguez 2000; Cuevas *et al.* 2005). Em geral, os resultados mostraram que a esterilidade masculina e o sucesso reprodutivo são flutuantes, pois variam entre populações de uma mesma espécie, e entre anos dentro de uma mesma população. No entanto, as variações no sucesso reprodutivo não se mostraram relacionadas com o nível de esterilidade masculina. Apesar de apresentarem os dois morfos florais, na prática, *E. campestre* e *E. deciduum* parecem não se comportar como tipicamente distílicas, uma vez que algumas populações exibiram diferenças na esterilidade masculina entre os morfos florais, sugerindo um processo de especialização sexual. Nestas espécies, as flores brevistilas apresentam esterilidade masculina maior que às longistilas, apresentando um sistema, parcialmente, ginodióico. Em *E. suberosum* e *E. tortuosum*, a distília parece ser um sistema mais estável, pois variações entre morfos florais foram, raramente, registradas. Abaixo, serão considerados os potenciais fatores genéticos, ecológicos e ambientais que, possivelmente, influenciaram as variações encontradas nas espécies de *Erythroxylum*, considerando a relevância de nossos achados para hipóteses relacionadas à evolução da especialização sexual.

As diferenças na esterilidade masculina entre populações de uma mesma espécie podem ser consequência de variações ambientais e/ou genéticas. Entretanto, diferenças entre anos dentro de uma mesma população podem estar ligadas, intimamente, a questões ambientais de cada área. Sabe-se que a esterilidade do pólen é influenciada por variáveis ambientais, como o déficit hídrico, que ocorrendo durante a microgametogênese induz a esterilidade masculina em muitas espécies, como em *Quercus ilex* Ten. (Saini 1997; Bykova *et al.* 2018). Desta forma, variações temporais e espaciais na precipitação e disponibilidade de água no solo da região estudada, poderiam explicar, parcialmente, a variação na viabilidade do pólen entre populações e anos. *Erythroxylum deciduum* foi a única espécie que não apresentou variação na esterilidade masculina entre anos. Curiosamente, as plantas desta espécie florescem de forma sincrônica após um período intenso de chuvas (obs. pess.), possivelmente, não passando por déficit hídrico. Apesar disto, esta espécie apresentou variações entre populações. Consequentemente, é possível que diferenças observadas entre populações também sejam resultado da variação na

frequência dos genes envolvidos na esterilidade masculina (e.g., alelos restauradores), como sugerido para *E. havanense* (Cuevas *et al.* 2005). Neste sentido, as populações estudadas com alta incidência de esterilidade masculina, como a de *E. suberosum* na área 10, pode ser uma consequência da raridade de alelos restauradores da viabilidade do pólen.

Os resultados sugerem que *E. campestre* e *E. deciduum* não se comportam como distílicas típicas porque exibem esterilidade masculina morfo-tendenciosa (brevistilo). Estudos encontraram resultados similares em *E. havanense*, com esterilidade masculina maior em plantas brevistilas (Domínguez *et al.* 1997; Cuevas *et al.* 2005). Inicialmente, sugeriu-se que o polimorfismo genético seria o fator chave para explicar a esterilidade morfo-tendenciosa (Domínguez *et al.* 1997). As mutações de esterilidade masculina ocorrem em ambos os morfos já que as mutações citoplasmáticas são transmitidas maternalmente. Contudo, se os alelos restauradores nucleares estiverem associados ao supergene heterostílico, serão esperadas variações na presença de esterilidade masculina entre os morfos. Caso os restaurados nucleares estejam associados ao haplótipo longistilo, os indivíduos deste morfo teriam duas cópias destes genes, já que o morfo longistila é homogamético (*ss*), e a função masculina seria restaurada. Por outro lado, o morfo brevistila é heterogamético (*Ss*) e possuiria apenas uma cópia do alelo restaurador. Como o haplótipo brevistilo é dominante sobre o longistilo (Ganders 1979b), genes restauradores não seriam expressos, produzindo pólen estéril (Domínguez *et al.* 1997). Entretanto, alguns resultados do presente estudo contradizem esta discussão, uma vez que diferenças na esterilidade entre morfos não foram encontradas em todas as populações de *E. campestre* e *E. deciduum*. Além disso, a população de *E. campestre* na área 6 exibiu esterilidade masculina maior em flores longistilas. Estudos adicionais que explorem os mecanismos que geram esterilidade masculina em espécies de *Erythroxylum* seriam úteis para determinar quais fatores estão envolvidas nos complexos padrões observados entre espécies e populações.

A complexidade dos padrões de esterilidade masculina é notada ainda quando uma população é estudada por vários anos. Na população de *E. campestre* estudada durante três anos, as flores brevistilas sempre tiveram níveis mais elevados de esterilidade masculina do que as longistilas. Este resultado é semelhante ao encontrado em dois anos para *E. havanense* (Rosas *et al.* 2005). Os autores discutiram que a diferença na esterilidade masculina entre morfos, juntamente com a sua expressão constante ao longo do tempo, sugere que a esterilidade masculina possui um componente hereditário independentemente da variação ambiental (Rosas *et al.* 2005). Entretanto, essa conclusão não pode ser inferida para todas espécies de *Erythroxylum*. Isto porque a população de *E. deciduum* teve diferença entre morfos apenas em

2015 e 2017, mostrando que variações na esterilidade masculina entre morfos podem não ser permanentes. Em populações ginodióicas de *Plantago coronopus* L. (Plantaginaceae), além de plantas hermafroditas e com esterilidade masculina completa, existem plantas com esterilidade masculina parcial (Koelewijn & Van Damme 1996). Nas populações desta espécie, a temperatura teve influência no nível de esterilidade masculina apenas em plantas parcialmente estéreis. Isso demonstra que fatores ambientais podem influenciar na restauração da fertilidade masculina, mas as respostas dos diferentes tipos florais podem não ser iguais (Koelewijn & Van Damme 1996). Desta forma, além do componente hereditário, a heterogeneidade ambiental também tem potencial para afetar a expressão sexual masculina e, portanto, influenciar na trajetória evolutiva da especialização sexual.

As espécies heterostílicas, geralmente, apresentam um sistema de incompatibilidade heteromórfico, e a seleção contra a endogamia ou a autofecundação não é colocada como uma possível “força motriz” para a evolução da especialização sexual (Bawa 1980). No entanto, algumas espécies apresentam quebra do sistema de incompatibilidade, como ocorre em espécies de Rubiaceae e Boraginaceae (Faria *et al.* 2012; Ferrero *et al.* 2017), podendo levar a níveis elevados de acasalamentos ilegítimos e aumento da endogamia. Desta forma, será que existe uma tendência de a especialização sexual ocorrer mais, frequentemente, em espécies heterostílicas autocompatíveis? Embora seja necessária uma análise mais ampla, considerando vários grupos heterostílicos com especialização sexual, os resultados com *Erythroxylum* podem sugerir que esta tendência não exista. Isto porque as duas espécies com especialização sexual apresentam sistemas de acasalamento distintos, sendo registrada autocompatibilidade em *E. campestre* e incompatibilidade auto e intramorfo em *E. deciduum*. Especialização sexual ocorre também em *E. havanense*, outra espécie com incompatibilidade auto e intramorfo completa (Domínguez *et al.* 1997). Portanto, estes resultados reforçam a hipótese de que a seleção contra a endogamia não é a principal pressão seletiva responsável pela evolução da especialização sexual em espécies distílicas, principalmente em *Erythroxylum*.

A esterilidade masculina é uma condição necessária, mas não suficiente, na sequência evolutiva em direção a ginodioicia e dioicia (Charlesworth & Charlesworth 1978; Schultz 1994; Domínguez *et al.* 1997), e esta condição parece ser representada por *E. suberosum* e *E. tortuosum*. Ambos os morfos florais destas espécies não expressaram a função masculina completa, porém não houve esterilidade masculina morfo-tendenciosa e estas duas espécies ainda podem ser consideradas distílicas. Além disso, as populações destas espécies não apresentaram diferenças no sucesso reprodutivo entre morfos. Estes resultados estão de acordo

com outros estudos com *E. suberosum* (Del-Carlo & Buzato 2006; Silva *et al.* 2016), agora confirmados também para *E. tortuosum*, mostrando que a esterilidade masculina, aparentemente, é bem disseminada neste gênero heterostílico, mesmo com a esterilidade morfo-tendenciosa nem sempre ocorrendo. As espécies de *Erythroxylum* apresentam ovário tricarpelar, trilocular e uniovular, de modo que apenas um dos carpelos é desenvolvido com um único óvulo, enquanto os outros são inférteis e nenhum primórdio de óvulo é registrado (Rao 1968; Loiola *et al.* 2007). Isso sugere que a alocação de recursos para a função feminina é retardada em algum momento e por algum motivo pode se refletir na esterilidade masculina, sendo uma maneira de equilibrar a equação e manter as flores hermafroditas (Silva *et al.* 2016). Embora esta hipótese possa justificar a ocorrência generalizada de esterilidade masculina em *Erythroxylum*, não explica a esterilidade morfo-tendenciosa de algumas espécies.

Foram encontradas, ocasionalmente, diferenças do sucesso reprodutivo entre morfos em algumas populações (23% delas) e anos, embora não tenham sido encontradas evidências claras que pudessem explicar pressões seletivas que comumente operam no processo de especialização sexual. Em espécies distílicas, uma única mutação de esterilidade em uma função sexual de um morfo poderia resultar em dioiccia funcional, pois tal mutação afetaria a função complementar do outro morfo (Rosas & Domínguez 2009). Contudo, as diferenças encontradas no sucesso reprodutivo não são explicadas pelo nível de esterilidade masculina. Em *E. deciduum*, por exemplo, a autoincompatibilidade heteromórfica poderia fazer com que a maior esterilidade do pólen nas flores brevistilas pudesse afetar a frutificação das plantas longistilas. Porém, as plantas longistilas frutificaram mais do que às brevistilas em algumas populações e anos. Além das flores brevistilas de *E. campestre* e *E. deciduum* terem maior esterilidade masculina, elas possuem menor produção de pólen do que às longistilas (Matias R. dados do primeiro capítulo), fazendo com que a magnitude da esterilidade masculina seja maior. Considerando estas duas características, as flores brevistilas de *E. campestre* e *E. deciduum* produziram cerca de 70 e 54% menos pólen viável que às longistilas, respectivamente. Apesar destes valores serem consideráveis, o grande número de pólen produzido e a esterilidade apenas parcial, faz com que as flores brevistilas ainda possuam muitos grãos de pólen viáveis (cerca de 741 grãos de pólen viáveis em *E. campestre* e 2635 em *E. deciduum*). Assim, é possível que a esterilidade masculina nas plantas brevistilas não tenha atingido um limiar que afete a frutificação das plantas longistilas, principalmente porque as flores possuem um único óvulo viável, fazendo com que uma quantidade mínima de pólen seja suficiente para a fecundação.

Outra pressão seletiva responsável pela evolução da dioicia em espécies distílicas é a limitação polínica e a assimetria no serviço de polinização (Beach & Bawa 1980; Horvitz & Schemske 1988). Em *Mussaenda parviflora* Miq. (Rubiaceae), sugere-se que a esterilidade masculina em flores longistilas tenha evoluído através do fluxo de pólen assimétrico (Naiki & Kato 1999). Embora a limitação polínica tenha sido encontrada em algumas populações de *Erythroxylum*, o nível de limitação polínica foi semelhante entre os morfos e os polinizadores das quatro espécies não demonstraram preferência por nenhum dos morfos (Matias R. dados do terceiro capítulo). O sistema de acasalamento indicou também que os morfos exibem o mesmo padrão de acasalamento dentro de cada espécie. Assim, a limitação polínica e o sistema de acasalamento não explicam as diferenças na taxa de frutificação entre morfos, embora estes fatores devam ser melhor investigados, uma vez que foram estudados em uma população de um único ano. Estudos mostram que a magnitude da limitação polínica é variável entre populações de *Narcissus assoanus* Dufour ex Schult. f. e *Linanthus* Benth. (Baker *et al.* 2000; Goodwillie 2001) e entre anos dentro das populações de *Trillium grandiflorum* (Michx.) Salisb. (Knight 2003). Uma diversidade de fatores pode variar entre populações e anos (e.g., densidade de plantas e polinizadores; espécies em cofloração; intensidade de floração), influenciando o nível de limitação polínica e, conseqüentemente, tendo um efeito na frutificação (Knight 2003; Del-Carlo & Buzato 2006; Ishihama *et al.* 2006). Neste sentido, a limitação polínica poderia explicar variações no sucesso reprodutivo entre anos e populações de *Erythroxylum*. As variações na taxa de frutificação entre anos também podem estar associadas ao investimento que as plantas fizeram em anos anteriores. Após um ano de alta produção de frutos, podem haver anos de baixa produção, simplesmente por esgotamento dos recursos das plantas.

Este trabalho apresentou evidências adicionais de que a esterilidade masculina é um fenômeno generalizado em *Erythroxylum*, e que algumas espécies podem exibir esterilidade masculina morfo-tendenciosa sugerindo um processo de especialização sexual. Existem um contínuo de estágios evolutivos entre o hermafroditismo e a dioicia (Ashman 2002). Neste sentido, os resultados sugerem que a distílica em *E. suberosum* e *E. tortuosum* seja um sistema, evolutivamente, estável, mas que a esterilidade masculina parcial dos indivíduos brevistilos de *E. campestre* e *E. deciduum* possa indicar uma evolução gradual para a ginodioicia. Contudo, a evolução para este sistema sexual depende de pressões evolutivas subseqüentes. Hipóteses comumente usadas para explicar a evolução da especialização sexual parecem não ser bem aplicáveis em espécies distílicas de *Erythroxylum* (ver também Domínguez *et al.* 1997). Portanto, nossos resultados reforçam a ideia de que as pressões seletivas que promovam a

especialização sexual em espécies de *Erythroxylum* não provêm da interação com os polinizadores, aumento da autofecundação e depressão por endogamia, mas podem vir de interações genéticas de dentro da planta (Domínguez 1995; Domínguez *et al.* 1997; Del-Carlo & Buzato 2006). Para uma melhor compreensão dos caminhos evolutivos das espécies de *Erythroxylum*, são necessários estudos adicionais averiguando se há uma compensação reprodutiva para a perda da função masculina através da realocação de recursos.

REFERÊNCIAS

- Arnold, S.J. 1994. Bateman's principles and the measurement of sexual selection in plants and animals. *The American Naturalist* 144: S126-S149.
- Ashman, T.L. 2002. The role of herbivores in the evolution of separate sexes from hermaphroditism. *Ecology* 83: 1175-1184.
- Ashman, T.L.; Knight, T.M.; Steets, J.A.; Amarasekare, P.; Burd, M.; Campbell, D.R.; Dudash, M.R.; Johnston, M.O.; Mazer, S.J.; Mitchell, R.J.; Morgan, M.T. & Willson, W.G. 2004. Pollen limitation of plant reproduction: ecological and evolutionary causes and consequences. *Ecology* 85: 2408-2421.
- Avila-Sakar, G. & Domínguez, C.A. 2000. Parental effects and gender specialization in a tropical heterostylous shrub. *Evolution* 54: 866-877.
- Baker, A.M.; Barrett, S.C.H. & Thompson, J.D. 2000. Variation of pollen limitation in the early flowering Mediterranean geophyte *Narcissus assoanus* (Amaryllidaceae). *Oecologia* 124: 529-535.
- Barrett, S.C.H. 1980. Dimorphic incompatibility and gender in *Nymphoides indica* (Menyanthaceae). *Canadian Journal of Botany* 58: 1938-1942.
- Barrett, S.C.H. 1992. Heterostylous genetic polymorphisms: model systems for evolutionary analysis. In: Barrett, S.C.H. (ed.) *Evolution and function of heterostyly*. Springer-Verlag, Berlin, Germany, p. 1-29.
- Barrett, S.C.H. 2002. The evolution of plant sexual diversity. *Nature Reviews Genetics* 3: 274-284.

- Barrett, S.C.H. & Richards, H.J. 1990. Heterostyly in tropical plants. *Memoirs of the New York Botanical Garden* 55: 35-61.
- Barrett, S.C.H. & Shore, J.S. 2008. New Insights on Heterostyly: Comparative Biology, Ecology and Genetics. In: Franklin-Tong, V.E. (ed.) *Self-incompatibility in flowering plants-evolution, diversity, and mechanisms*. Springer-Verlag, Berlin, Germany, p. 3-32.
- Barros, M.G. 1998. Sistemas de polinização em espécies simpátricas de *Erythroxylum* P. Br. (Erythroxylaceae) do Brasil. *Brazilian Journal of Botany* 21: 159-166.
- Bates, D.; Maechler, M.; Bolker, B. & Walker, S. 2014. lme4: Linear mixed-effects model using Eigen and S4. R package version 1.1-6. Disponível em: <http://CRAN.R-project.org/package=lme4>
- Bawa, K.S. 1980. Evolution of dioecy in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 11: 15-39.
- Bawa, K.S. & Opler, P.A. 1975. Dioecism in tropical forest trees. *Evolution* 29: 167-179.
- Beach, J.H. & Bawa, K.S. 1980. Role of pollinators in the evolution of dioecy from distyly. *Evolution* 34: 1138-1142.
- Berry, P.E.; Tobe, H. & Gómez, J.A. 1991. Agamospermy and the loss of distyly in *Erythroxylum undulatum* (Erythroxylaceae) from northern Venezuela. *American Journal of Botany* 78: 595-600.
- Bullock, S.H. 1985. Breeding systems in the flora of a tropical deciduous forest. *Biotropica* 17: 287-301.
- Bykova, O.; Limousin, J.M.; Ourcival, J.M. & Chuine, I. 2018. Water deficit disrupts male gametophyte development in *Quercus ilex*. *Plant Biology* 20: 450-455.
- Charlesworth, D. 1999. Theories of the evolution of dioecy. In: Geber, M.A.; Dawson, T.E. & Delph, L.F. (eds.) *Gender and Sexual Dimorphism in Flowering Plants*. Springer Verlag, Berlin. p. 33-60.
- Charlesworth, B. & Charlesworth, D. 1978. A model for the evolution of dioecy and gynodioecy. *American Naturalist* 112: 975-997.

- Charlesworth, D. & Charlesworth, B. 1979. A model for the evolution of distyly. *American Naturalist* 114: 467-498.
- Cuevas, G.E.; Molina-Freaner, F.; Eguiarte, L.E. & Domínguez, C.A. 2005. Patterns of male sterility within and among populations of the distylous shrub *Erythroxylum havanense* (Erythroxylaceae). *Plant Ecology* 176: 165-172.
- Darwin, C. 1877. *The Different Form of Flowers of the Same Species*. John Murray, London.
- Del-Carlo, S. & Buzato, S. 2006. Male sterility and reproductive output in distylous *Erythroxylum suberosum* (Erythroxylaceae). *Biological Journal of the Linnean Society* 88: 465-474.
- Domínguez, C.A. 1995. Genetics conflicts of interest in plants. *Trends in Ecology and Evolution* 10: 412-416.
- Domínguez, C.A.; Avila-Sakar, G.; Vizquez-Santana, S. & Mairquez-Guzmain, J. 1997. Morph-biased male sterility in the tropical distylous shrub *Erythroxylum havanense* (Erythroxylaceae). *American Journal of Botany* 84: 626-632.
- Ernst, A. 1955. Self-fertility in monomorphic primulas. *Genetica* 27: 391-448.
- Faria, R.R.; Ferrero, V.; Navarro, L. & Araujo, A.C. 2012. Flexible mating system in distylous populations of *Psychotria carthagenensis* Jacq. (Rubiaceae) in Brazilian Cerrado. *Plant Systematics and Evolution* 298: 619-627.
- Ferrero, V.; Barrett, S.C.H.; Rojas, D.; Arroyo, J. & Navarro, L. 2017. Associations between sex-organ deployment and morph bias in related heterostylous taxa with different stylar polymorphisms. *American Journal of Botany* 104: 1-12.
- Fox, J. & Weisberg, S. 2011. *An {R} companion to applied regression*. 2nd ed. Sage Publications, Los Angeles.
- Ganders, F.R. 1979a. Heterostyly in *Erythroxylum coca* (Erythroxylaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 78: 11-20.
- Ganders, F.R. 1979b. The biology of heterostyly. *New Zealand Journal of Botany* 17: 607-635.

- García-Robledo, C. 2008. Asymmetry in pollen flow promotes gender specialization in morphs of the distylous neotropical herb *Arcytophyllum lavarum* (Rubiaceae). *Evolutionary Ecology* 22: 743-755.
- Goodwillie, C. 2001. Pollen limitation and the evolution of self-compatibility in *Linanthus* (Polemoniaceae). *International Journal of Plant Sciences* 162:1283-1292.
- Horvitz, C.C. & Schemske, D.W. 1988. A test of the pollinator limitation hypothesis for a neotropical herb. *Ecology* 69: 200-206.
- Ishihama, F.; Ueno, S.; Tsumura, Y. & Washitani, I. 2006. Effects of density and floral morph on pollen flow and seed reproduction of an endangered heterostylous herb, *Primula sieboldii*. *Journal of Ecology* 94: 846-855.
- Knight, T.M. 2003. Floral density, pollen limitation, and reproductive success in *Trillium grandiflorum*. *Oecologia* 142: 557-563.
- Koelewijn, H.P. & Van Damme, J.M.M. 1996. Gender variation, partial male sterility and labile sex expression in gynodioecious *Plantago coronopus*. *New Phytologist* 132: 67-76.
- Lau, P. & Bosque, C. 2003. Pollen flow in the distylous *Palicourea fendleri* (Rubiaceae): an experimental test of the disassortative pollen flow hypothesis. *International Association for Ecology* 135: 593-600.
- Lenth, R. 2017. emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means. R package version 1.0. <https://github.com/rvlenth/emmeans>
- Lloyd, D.G. 1979. Evolution toward dioecy in heterostylous populations. *Plant Systematics and Evolution* 131: 71-80.
- Loiola, M.I.B.; Agra, M.F.; Baracho, G.S. & Queiroz, R.T. 2007. Flora da Paraíba, Brasil: Erythroxylaceae Kunth. *Acta Botanica Brasilica* 21: 473-487.
- Martin, F.W. 1959. Staining and observing pollen tubes in style by means of fluorescence. *Stain Technology* 34: 125-128.
- Muenchow, G.E. & Grebus, M. 1989. The evolution of dioecy from distyly, reevaluation of the hypothesis of the loss of long-tongued pollinators. *American Naturalist* 133: 149-156.

- Naiki, A. & Kato, M. 1999. Pollination system and evolution of dioecy from distyly in *Mussaenda parviflora* (Rubiaceae). *Plant Species Biology* 14: 217-227.
- Opler, P.A.; Baker, H.G. & Frankie, G.W. 1975. Reproductive biology of some Costa Rican *Cordia* species (Boraginaceae). *Biotropica* 7: 234-247.
- Ornduff, R. 1975. Heterostyly and pollen flow in *Hypericum aegypticum* (Guttiferae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 71:51-57.
- Paillet, T.; Humeau, L. & Thompson, J.D. 1998. Distyly and heteromorphic incompatibility in oceanic island species of *Erythroxylum* (Erythroxylaceae). *Plant Systematics and Evolution* 213: 187-198.
- Plowman, T. & Hensold, N. 2004. Names, types and distribution of neotropical species of *Erythroxylum* (Erythroxylaceae). *Brittonia* 56: 1-53.
- R Core Team. 2017. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rao, D. 1968. A contribution to the embryology of Erythroxylaceae. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences* 38: 53-65.
- Renner, S.S. 2014. The relative and absolute frequencies of angiosperm sexual systems: Dioecy, monoecy, gynodioecy, and an updated online database. *American Journal of Botany* 101: 1588-1596.
- Renner, S.S. & Ricklefs, R.E. 1995. Dioecy and its correlates in the flowering plants. *American Journal of Botany* 82: 596-606.
- Rosas, L.F. & Domínguez, C.A. 2009. Male sterility, fitness gain curves and the evolution of gender specialization from distyly in *Erythroxylum havanense*. *Journal of Evolutionary Biology* 22: 50-59.
- Rosas, L.F.; Pérez-Alquicira, J. & Domínguez, C.A. 2005. Environmentally induced variation in fecundity compensation in the morph-biased male-sterile distylous shrub *Erythroxylum havanense* (Erythroxylaceae). *American Journal of Botany* 92: 116-122.

- Sabath, N.; Goldberg, E.E.; Glick, L.; Einhorn, M.; Ashman, T.L.; Ming, R.; Otto, S.P.; Vamosi, J.C. & Mayrose, I. 2016. Dioecy does not consistently accelerate or slow lineage diversification across multiple genera of angiosperms. *New Phytologist* 209: 1290-1300.
- Saini, H.S. 1997. Effects of water stress on male gametophyte development in plants. *Sex Plant Reproduction* 10: 67-73.
- Schultz, S.T. 1994. Nucleo-cytoplasmic male sterility and alternative routes to dioecy. *Evolution* 48: 1933-1945.
- Silva, L.; Fernandes, C.L.; Simão, E. & Nakamura, A.T. 2016. Development of anthers and pollen in Brazilian heterostylic species of *Erythroxylum* (Erythroxylaceae): an ecological approach. *Pakistan Journal of Botany* 48: 2047-2055.
- Thomson, J.D. & Brunet, J. 1990. Hypotheses for the evolution of dioecy in seed plants. *Trends in Ecology & Evolution* 5: 11-16.
- 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.
- Willson, M.F. 1994. Sexual selection in plants: perspective and overview. *The American Naturalist* 144: S13-S39.

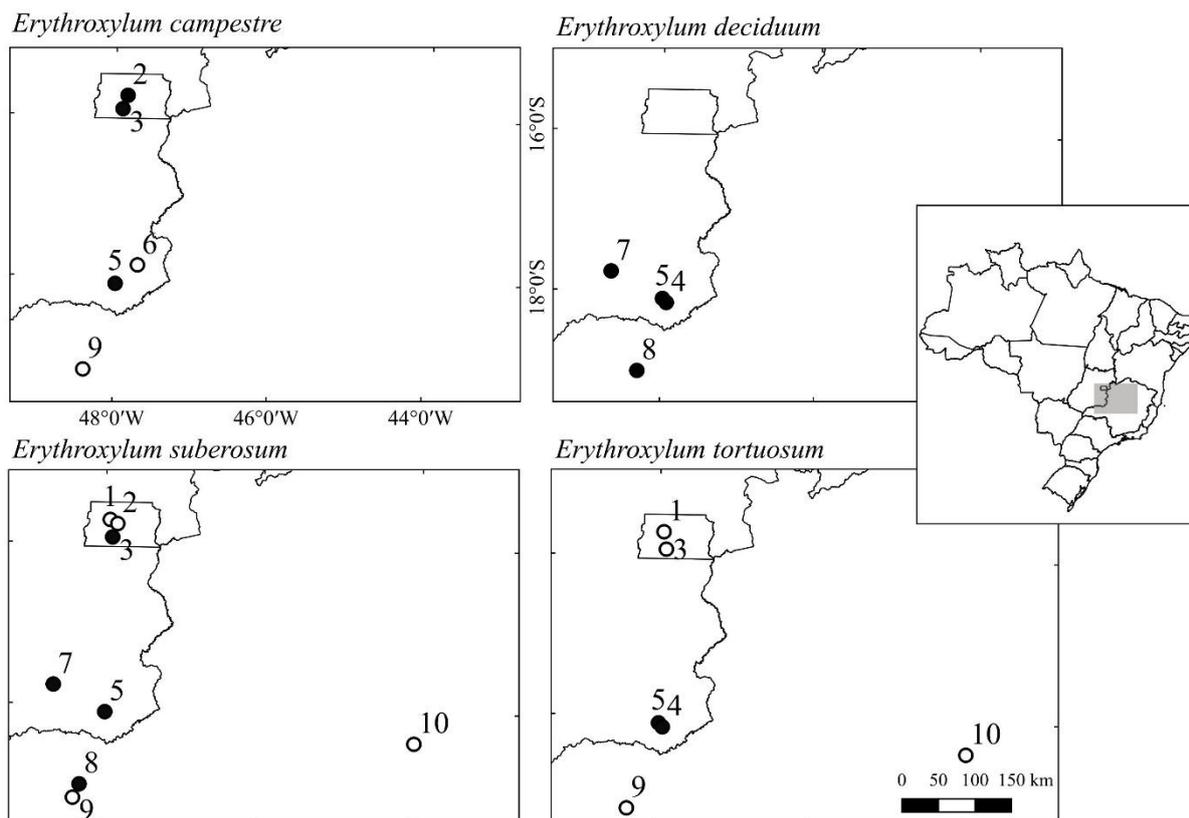
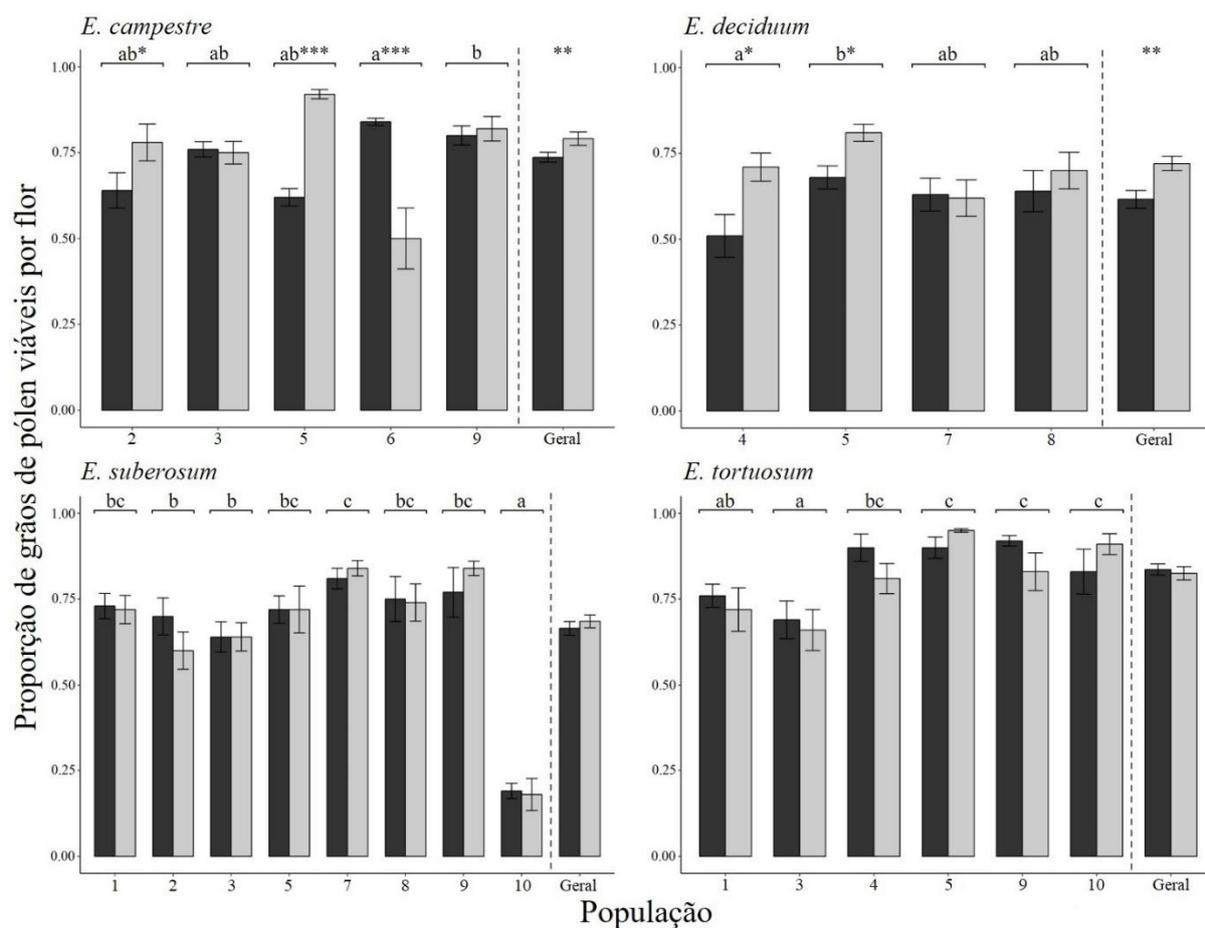


Figura 1. Distribuição geográfica das populações das quatro espécies de *Erythroxylum* (Erythroxylaceae) analisadas em 10 áreas de Cerrado do Brasil Central. O sucesso reprodutivo feminino foi avaliado somente nas populações com pontos pretos, enquanto que a esterilidade masculina foi estudada em todas as populações (pontos pretos e brancos). Nome das áreas: 1 - Parque Nacional; 2 - APA do Paranoá; 3 - RECOR; 4 - Pasto do Pedrinho; 5 - Fazenda Pé do Morro; 6 - Pires Belo; 7 - PESCAN; 8 - Clube Caça & Pesca Itororó; 9 - Estação Ecológica do Panga; 10 - Pedra da Baleia.



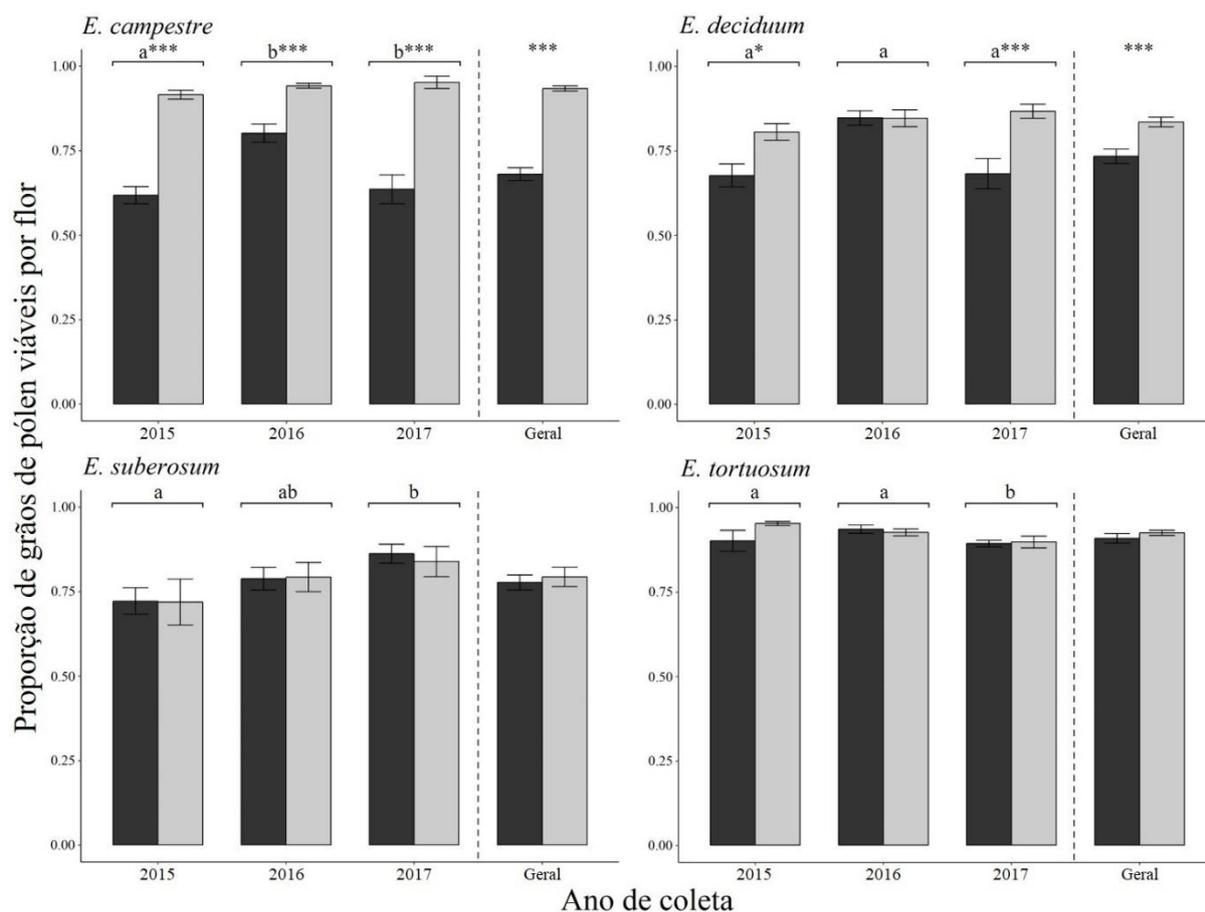


Figura 3. Comparações da viabilidade dos grãos de pólen entre flores brevistilas (barras pretas) e longistilas (barras cinzas) em diferentes anos de coleta dentro de uma mesma população para quatro espécies de *Erythroxylum*. As populações estudadas são as da área 5 (ver Figura 1 para localização da área). Os resultados são mostrados em média e erro padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os anos de coleta de uma mesma espécie ($P < 0.05$). Os asteriscos referem-se a diferenças estatisticamente significativas entre morfos dentro de cada ano ou em nível geral, considerando o conjunto de dados de todos os anos (*** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$).

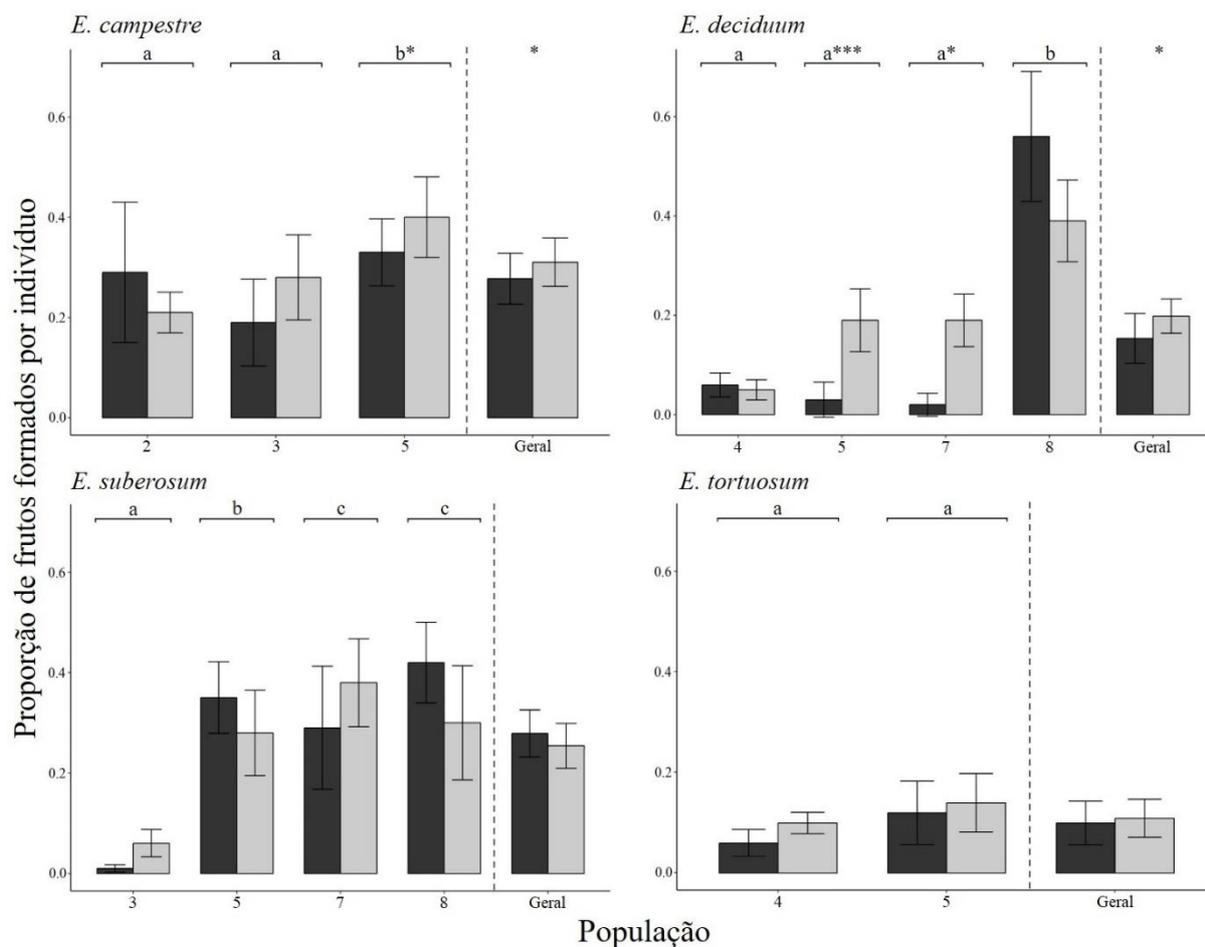


Figura 4. Comparações do sucesso reprodutivo entre indivíduos brevistilos (barras pretas) e longistilos (barras cinzas) em diferentes populações de quatro espécies de *Erythroxylum*. Os locais de coleta de cada população são mostrados na Figura 1. Os resultados são mostrados em média e erro padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre populações de uma mesma espécie ($P < 0.05$). Os asteriscos referem-se a diferenças estatisticamente significativas entre morfos dentro das populações ou em nível geral, considerando o conjunto de dados de todas as populações ($***P < 0.001$; $**P < 0.01$; $*P < 0.05$).

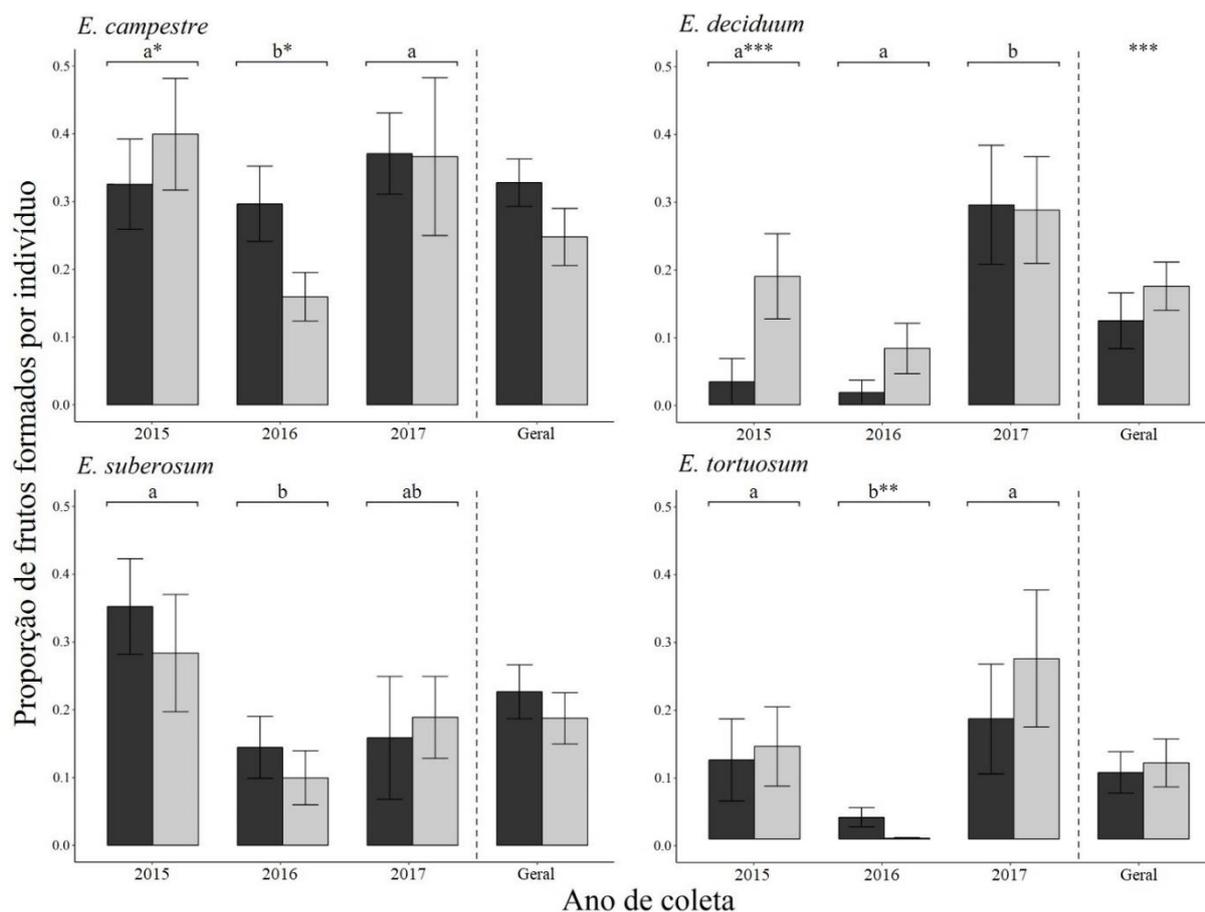


Figura 5. Comparações do sucesso reprodutivo entre indivíduos brevistilos (barras pretas) e longistilos (barras cinzas) em diferentes anos de coleta dentro de uma mesma população para quatro espécies de *Erythroxylum*. As populações estudadas são as da área 5 (ver Figura 1 para localização da área). Os resultados são mostrados em média e erro padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os anos de coleta de uma mesma espécie ($P < 0.05$). Os asteriscos referem-se a diferenças estatisticamente significativas entre morfos dentro de cada ano ou em nível geral, considerando o conjunto de dados de todos os anos (*** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$).

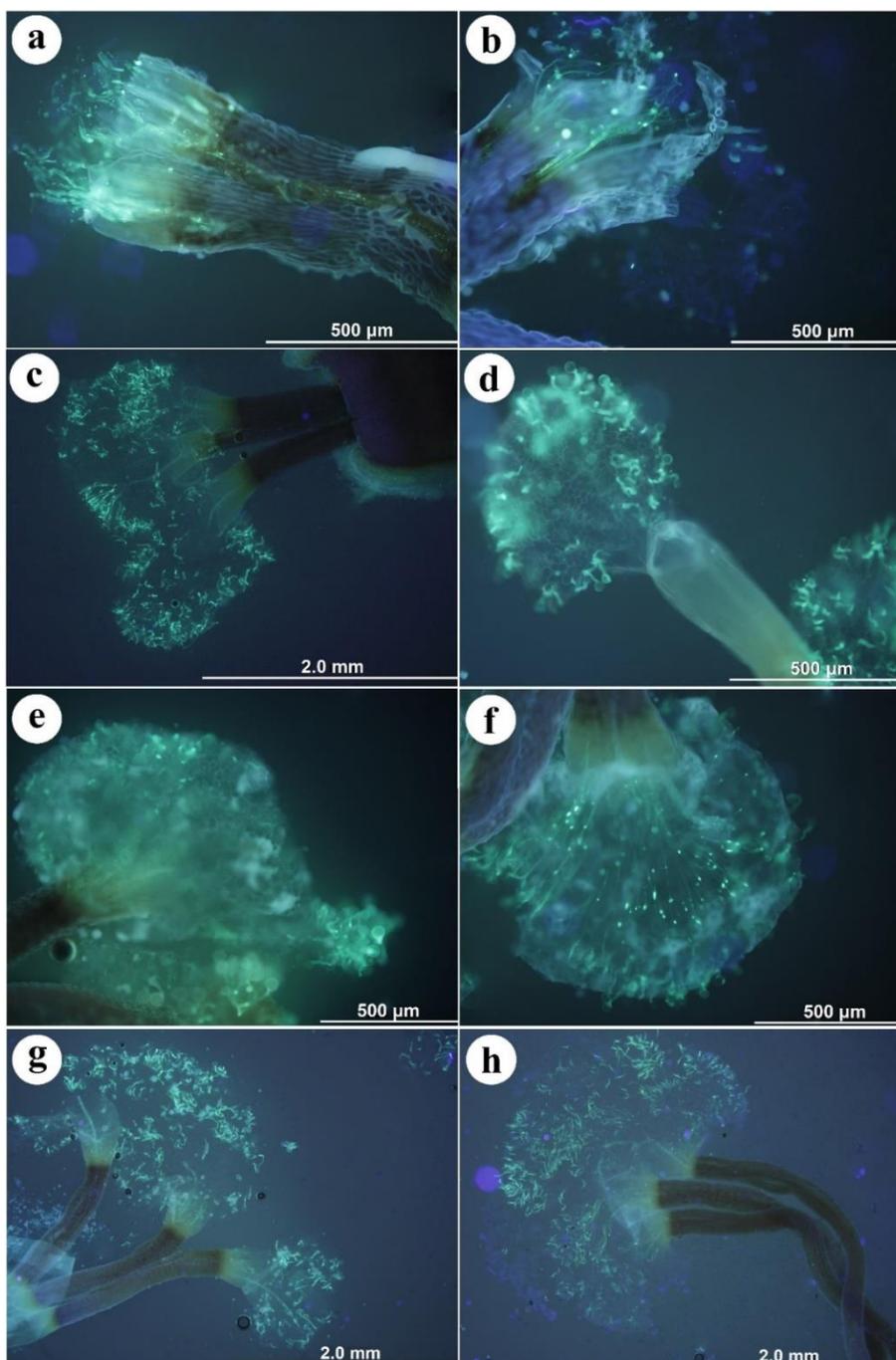


Figura 6. Crescimento dos tubos polínicos em pistilos polinizados manualmente em quatro espécies de *Erythroxylum*. As populações estudadas são as da área 5 (ver Figura 1 para localização da área). *Erythroxylum campestre*: tubos polínicos chegando no final do estilete de flor brevistila (a) e longistila (b) após autopolinização. *Erythroxylum deciduum*: inibição dos tubos polínicos nos estigmas de flor brevistila (c) e longistila (d) após autopolinização. *Erythroxylum suberosum*: inibição dos tubos polínicos no estigma de flor brevistila (e) e no estilete de flor longistila (f) após autopolinização. *Erythroxylum tortuosum*: inibição dos tubos polínicos nos estigmas de flor brevistila após autopolinização (g) e nos estiletos de flor longistila após polinização cruzada intramorfo (h).

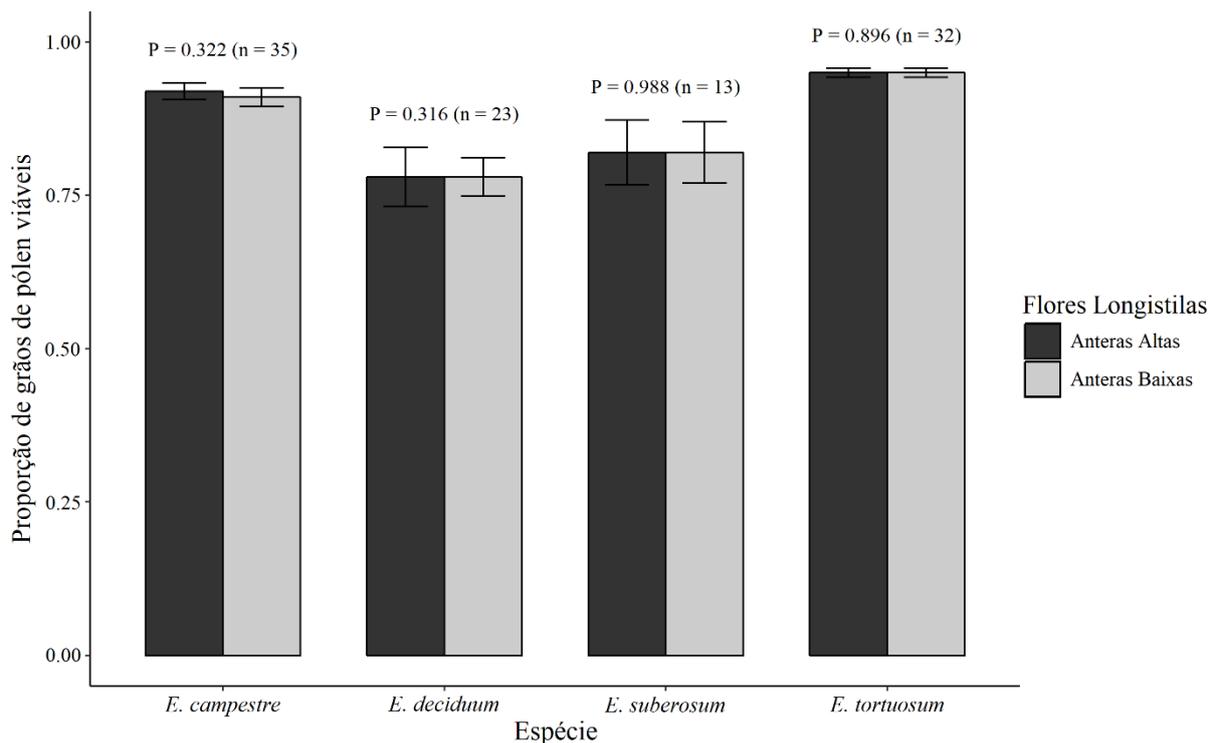


Figura S1. Comparações da viabilidade dos grãos de pólen entre anteras mais altas e mais baixas em flores longistilas de quatro espécies de *Erythroxylum* utilizando teste t para amostras pareadas. Não houve diferença significativa em nenhuma das quatro comparações ($P > 0.05$). Os números de flores utilizadas no experimento estão entre parênteses. Os dados são referentes às populações da área 5 (ver Figura 1 para localização da área) e foram transformados em logit (logaritmo para transformação de dados proporcionais) quando não atingiram normalidade. Os resultados são mostrados em média e erro padrão.

Tabela 1. Resultados das análises dos modelos lineares (GLMs para sucesso reprodutivo feminino e GLMMs para esterilidade masculina) averiguando variações temporais e espaciais na esterilidade masculina e no sucesso reprodutivo feminino de quatro espécies de *Erythroxyllum*. As comparações entre populações de uma mesma espécie foram feitas utilizando dados coletados no mesmo ano, e comparações entre anos de coleta foram realizadas com dados de apenas uma população de cada espécie (ver Material e Métodos para mais detalhes). Os valores em negrito representam diferenças estatisticamente significativas.

Fonte de variação	<i>E. campestre</i>			<i>E. deciduum</i>			<i>E. suberosum</i>			<i>E. tortuosum</i>		
	χ^2	d.f.	P	χ^2	d.f.	P	χ^2	d.f.	P	χ^2	d.f.	P
Esterilidade masculina												
Variações espaciais												
Morfo	9.277	1	0.002	6.900	1	0.008	0.127	1	0.722	0.600	1	0.438
População	9.757	4	0.045	8.853	3	0.031	217.377	7	<0.001	64.410	5	<0.001
População x Morfo	50.839	4	<0.001	3.805	3	0.283	7.226	7	0.406	5.583	5	0.349
Variações temporais												
Morfo	181.285	1	<0.001	12.263	1	<0.001	0.321	1	0.571	0.503	1	0.478
Ano de coleta	16.278	2	<0.001	2.288	2	0.319	6.224	2	0.045	8.925	2	0.012
Ano de coleta x Morfo	9.854	2	0.007	6.344	2	0.042	0.163	2	0.922	2.183	2	0.336
Sucesso reprodutivo												
Variações espaciais												
Morfo	5.191	1	0.023	6.198	1	0.013	0.120	1	0.729	0.494	1	0.482
População	34.554	2	<0.001	111.506	3	<0.001	179.203	3	<0.001	0.260	1	0.611
População x Morfo	2.849	2	0.241	29.361	3	<0.001	7.144	3	0.067	0.003	1	0.955
Variações temporais												
Morfo	0.033	1	0.857	17.724	1	<0.001	0.240	1	0.624	0.010	1	0.922
Ano de coleta	11.732	2	0.003	40.795	2	<0.001	19.631	2	<0.001	175.85	2	<0.001
Ano de coleta x Morfo	10.459	2	0.005	11.976	2	0.002	1.0246	2	0.599	22.840	2	<0.001

Tabela 2. Proporção de frutos formados em indivíduos brevistilos e longistilos após tratamentos de polinização manual e índices de autoincompatibilidade (ISI) em quatro espécies de *Erythroxylum* (ver Material e Métodos para mais detalhes). As populações estudadas são as da área 5 (ver Figura 1 para localização da área). O número de indivíduos utilizados nos tratamentos está entre parênteses. Os tratamentos dentro da mesma espécie que possuem diferentes letras sobrescritas foram diferentes significativamente entre si no nível de 0.05 em testes post-hoc. Não existem diferenças significativas entre os morfos dentro de cada tratamento.

Espécie/Tratamento sistema de acasalamento	Proporção média (\pm erro padrão) de frutos formados por indivíduo	
	Brevistila (n)	Longistila (n)
<i>E. campestre</i>		
Agamospermia ^a	0.07 \pm 0.05 (7)	0.07 \pm 0.05 (7)
Autopolinização espontânea ^b	0.53 \pm 0.10 (7)	0.56 \pm 0.10 (7)
Autopolinização manual ^b	0.48 \pm 0.10 (7)	0.50 \pm 0.10 (7)
Polinização cruzada intramorfo ^b	0.61 \pm 0.09 (7)	0.54 \pm 0.12 (7)
Polinização cruzada intermorfo ^b	0.54 \pm 0.10 (6)	0.48 \pm 0.11 (7)
Controle ^a	0.30 \pm 0.09 (7)	0.06 \pm 0.04 (8)
ISI	0.89	1.04
<i>E. deciduum</i>		
Agamospermia ^a	0.00 \pm 0.00 (8)	0.00 \pm 0.00 (6)
Autopolinização espontânea ^a	0.00 \pm 0.00 (8)	0.00 \pm 0.00 (7)
Autopolinização manual ^a	0.00 \pm 0.00 (8)	0.00 \pm 0.00 (7)
Polinização cruzada intramorfo ^a	0.00 \pm 0.00 (8)	0.04 \pm 0.04 (6)
Polinização cruzada intermorfo ^b	0.36 \pm 0.12 (8)	0.15 \pm 0.07 (6)
Controle ^a	0.03 \pm 0.03 (8)	0.14 \pm 0.07 (7)
ISI	0.00	0.00
<i>E. suberosum</i>		
Agamospermia ^a	0.00 \pm 0.00 (7)	0.00 \pm 0.00 (7)
Autopolinização espontânea ^a	0.11 \pm 0.06 (8)	0.00 \pm 0.00 (7)
Autopolinização manual ^a	0.06 \pm 0.06 (7)	0.00 \pm 0.00 (7)
Polinização cruzada intramorfo ^a	0.09 \pm 0.06 (7)	0.00 \pm 0.00 (7)
Polinização cruzada intermorfo ^b	0.61 \pm 0.11 (7)	0.46 \pm 0.10 (7)
Controle ^a	0.14 \pm 0.07 (8)	0.13 \pm 0.05 (7)
ISI	0.10	0.00
<i>E. tortuosum</i>		
Agamospermia ^a	0.00 \pm 0.00 (7)	0.00 \pm 0.00 (7)
Autopolinização espontânea ^a	0.00 \pm 0.00 (7)	0.00 \pm 0.00 (7)
Autopolinização manual ^a	0.00 \pm 0.00 (8)	0.00 \pm 0.00 (7)
Polinização cruzada intramorfo ^a	0.00 \pm 0.00 (7)	0.00 \pm 0.00 (7)
Polinização cruzada intermorfo ^b	0.48 \pm 0.08 (6)	0.26 \pm 0.06 (7)
Controle ^a	0.05 \pm 0.03 (7)	0.00 \pm 0.00 (7)
ISI	0.00	0.00

Tabela 3. Resultados das análises dos modelos lineares (GLMs para sistema de acasalamento e GLMMs para limitação polínica) comparando a produção de frutos após diferentes tratamentos de polinização com intuito de investigar o sistema de acasalamento e a limitação polínica (ver Material e Métodos para mais detalhes) em quatro espécies de *Erythroxylum*. As populações estudadas são as da área 5 (ver Figura 1 para localização da área). Os valores em negrito representam diferenças estatisticamente significativas.

Fonte de variação	<i>E. campestre</i>			<i>E. deciduum</i>			<i>E. suberosum</i>			<i>E. tortuosum</i>		
	χ^2	d.f.	P	χ^2	d.f.	P	χ^2	d.f.	P	χ^2	d.f.	P
Sistema de acasalamento												
Morfo	0.005	1	0.943	0.000	1	1.000	0.000	1	1.000	0.000	1	1.000
Tratamento	27.102	5	<0.001	46.453	5	<0.001	48.420	5	<0.001	59.867	5	<0.001
Tratamento x Morfo	5.852	5	0.321	8.582	5	0.127	7.390	5	0.193	1.220	5	0.943
Limitação polínica												
Morfo	0.020	1	0.889	1.201	1	0.273	0.053	1	0.817	0.010	1	0.922
Tratamento	3.962	1	0.047	0.425	1	0.515	8.445	1	0.004	9.938	1	0.002
Tratamento x Morfo	0.049	1	0.825	3.329	1	0.068	1.798	1	0.180	1.818	1	0.178

Tabela 4. Proporção de frutos formados em indivíduos brevistilos e longistilos de quatro espécies de *Erythroxylum* após tratamentos de polinização em flores abertas para investigar a ocorrência de limitação polínica (ver Material e Métodos para mais detalhes). As populações estudadas são as da área 5 (ver Figura 1 para localização da área). O número de indivíduos utilizados nos tratamentos está entre parênteses.

Espécie/Tratamento limitação polínica	Proporção média (\pm erro padrão) de frutos formados por indivíduo	
	Brevistila (n)	Longistila (n)
<i>E. campestre</i>		
Suplementação de pólen	0.54 \pm 0.11 (11)	0.53 \pm 0.12 (10)
Controle	0.37 \pm 0.06 (11)	0.37 \pm 0.12 (10)
<i>E. deciduum</i>		
Suplementação de pólen	0.48 \pm 0.11 (11)	0.17 \pm 0.08 (11)
Controle	0.30 \pm 0.09 (11)	0.29 \pm 0.08 (11)
<i>E. suberosum</i>		
Suplementação de pólen	0.42 \pm 0.13 (11)	0.33 \pm 0.10 (11)
Controle	0.16 \pm 0.09 (11)	0.19 \pm 0.06 (11)
<i>E. tortuosum</i>		
Suplementação de pólen	0.49 \pm 0.09 (11)	0.39 \pm 0.11 (11)
Controle	0.18 \pm 0.08 (11)	0.27 \pm 0.10 (11)

Tabela S1. Localização das áreas investigadas neste estudo. DF= Distrito Federal; GO= Goiás; MG= Minas Gerais.

Região e nome das áreas	Código da área	Coordenadas
Brasília (DF) - Parque Nacional de Brasília	1	15°43'S, 47°57'W
Brasília (DF) - APA do Paranoá	2	15°45'S, 47°51'W
Brasília (DF) - RECOR	3	15°56'S, 47°55'W
Catalão (GO) - Pasto do Pedrinho	4	18°09'S, 47°56'W
Catalão (GO) - Fazenda Pé do Morro	5	18°06'S, 47°59'W
Catalão (GO) - Pires Belo	6	17°52'S, 47°42'W
Caldas Novas (GO) - PESCAN	7	17°46'S, 48°39'W
Uberlândia (MG) - Clube Caça & Pesca Itororó	8	19°00'S, 48°18'W
Uberlândia (MG) - Estação Ecológica do Panga	9	19°10'S, 48°23'W
Diamantina (MG) - Pedra da Baleia	10	18°24'S, 43°60'W

CAPÍTULO 3

Especialização sexual está relacionada com compensação reprodutiva? uma investigação com espécies distílicas de *Erythroxylum* (Erythroxylaceae)

RESUMO: A presença de esterilidade masculina parcial em plantas brevistilas parece representar o primeiro passo na evolução da especialização sexual em espécies distílicas de *Erythroxylum*. No entanto, para que as plantas masculinas-estéreis persistam, elas devem ter alguma vantagem reprodutiva que compense a perda da função masculina. A presença de espécies com e sem especialização sexual faz com que *Erythroxylum* seja um excelente modelo para testar se as diferenças reprodutivas entre os morfos florais são resultado de uma compensação feminina. O objetivo deste estudo foi comparar a frequência de polinizadores, predação de sementes e várias outras características reprodutivas entre plantas brevistilas e longistilas de quatro *Erythroxylum*, sendo duas com especialização sexual (*E. campestre* e *E. deciduum*) e duas sem especialização (*E. suberosum* e *E. tortuosum*). A hipótese é que somente as espécies com especialização sexual apresentem variações entre morfos como resultado de uma vantagem compensatória feminina das plantas brevistilas, que são parcialmente masculinas-estéreis. Como esperado, os resultados mostraram que para as espécies que não apresentam especialização sexual, os morfos não diferem significativamente em nenhum parâmetro reprodutivo examinado. No entanto, apesar de diferenças entre morfos ocorrerem somente nas espécies com especialização sexual, nenhuma das variações encontradas evidenciam uma vantagem compensatória feminina das plantas brevistilas. A esterilidade masculina apenas parcial e a aparente falta de compensação feminina nas plantas brevistilas de *E. campestre* e *E. deciduum*, podem ser interpretadas como evidência de uma origem evolutiva relativamente recente em direção à ginodioiccia. No entanto, a falta de compensação feminina pode representar uma restrição à evolução da esterilidade masculina nas plantas brevistilas, e conseqüentemente, à evolução da ginodioiccia.

PALAVRAS-CHAVE: alocação de recursos, aptidão feminina, Cerrado, esterilidade masculina morfo-tendenciosa, ginodioiccia, heterostilia, sistema sexual, vantagem compensatória.

INTRODUÇÃO

A evolução da especialização sexual nas plantas tem sido uma das questões de destaque na biologia evolutiva. Evitar endogamia é uma das importantes forças seletivas que favorecem a especialização sexual, principalmente em plantas autocompatíveis que exibem altos níveis de depressão por endogamia (Charlesworth & Charlesworth 1978; Bawa 1980; Thomson & Barrett 1981; Thomson & Brunet 1990). Desta forma, separar as funções masculina e feminina em

flores hermafroditas reduziria a frequência de autofecundação. No entanto, a especialização sexual também tem ocorrido em espécies autoincompatíveis (Van de Paer *et al.* 2015). Nestas plantas, têm sido propostas outras explicações baseadas em modelos teóricos de seleção sexual e alocação de recursos para a evolução da especialização sexual (Bawa & Beach 1981; Charlesworth & Charlesworth 1981; Charnov 1982; Thomson & Brunet 1990). Estes modelos baseiam-se no pressuposto de que as plantas hermafroditas podem exibir alocação diferencial de recursos entre as funções masculina e feminina. Consequentemente, estudos com plantas sexualmente dimórficas, normalmente, encontram variações relacionadas ao gênero envolvendo um ou mais atributos reprodutivos, morfológicos ou ecológicos (Ramsey & Vaughton 2002; Dufay & Billard 2012; Van der Meer *et al.* 2017).

Em populações ginodióicas, algumas plantas possuem flores hermafroditas e outras são masculinas-estéreis com apenas flores femininas. As plantas com esterilidade masculina têm uma desvantagem gamética, uma vez que contribuem com genes para a próxima geração apenas via óvulos, enquanto que as plantas hermafroditas contribuem através do pólen e óvulos. Para que as plantas masculinas-estéreis sejam mantidas na população, elas devem apresentar alguma vantagem reprodutiva em relação às hermafroditas, compensando, assim, a perda da função sexual masculina (Charlesworth 1981; Gouyon & Couvet 1987; Delph *et al.* 1999). Esta compensação feminina pode ser adquirida por uma realocação de recursos em consequência do investimento reduzido na função masculina (Avila-Sakar & Domínguez 2000; Campbell 2000). A magnitude da compensação feminina necessária para manter os indivíduos masculinos-estéreis na população é determinada pelo modo de herança da esterilidade masculina. No caso da herança nuclear, as plantas masculinas-estéreis devem ter pelo menos uma aptidão feminina duas vezes maior em relação às hermafroditas (Lewis 1941; Charlesworth & Charlesworth 1978; Van Damme & Van Damme 1986). Se a herança da mutação sexual for conduzida por genes citoplasmáticos ou nucleares-citoplasmáticos, diferenças menores são suficientes (Ross & Gregorius 1985; Frank 1989).

A especialização sexual parece ocorrer frequentemente em *Erythroxylum* P. Browne, um gênero de plantas morfológicamente distílico. Em um estudo relacionado, foi mostrado que as plantas brevistilas de *E. campestre* St. Hil. e *E. deciduum* A. St. Hil., geralmente, apresentam grãos de pólen menos viáveis do que as plantas longistilas, exibindo um sistema, parcialmente, ginodióico (Matias R. dados do segundo capítulo). Contudo, não se sabe ainda se estas espécies exibem diferenças reprodutivas entre morfos em consequência de um efeito compensatório feminino. Em populações de *E. havanense* Jacq., o mesmo padrão de esterilidade masculina foi

encontrado, de modo que as plantas brevistilas, com especialização sexual feminina, tiveram realocação de recursos na produção de mais frutos e sementes, maior velocidade e sucesso de maturação das sementes, melhor taxa de germinação e um desempenho vegetativo superior às plantas longistilas (Avila-Sakar & Domínguez 2000; Cuevas *et al.* 2005; Rosas *et al.* 2005). A compensação feminina também pode ser alcançada de outras formas, como maior habilidade competitiva, maior produção de flores e produção de sementes maiores e mais pesadas que têm maior capacidade de germinação (Shykoff *et al.* 2003; Dufay & Billard 2012). Desta forma, a evolução da especialização sexual em espécies distílicas pode levar a diferenças reprodutivas entre plantas brevistilas e longistilas como resultado de uma compensação feminina.

A esterilidade masculina e suas vantagens compensatórias feminina são parâmetros importantes na evolução da especialização sexual em plantas sexualmente dimórficas. No entanto, poucos estudos consideraram os efeitos combinados da esterilidade masculina com o contexto ecológico em que as plantas expressam a compensação feminina (mas ver, Marshal & Ganders 2001; Ramsey & Vaughton 2002; Ashman *et al.* 2004; Cole & Ashman 2005; Stone & Olson 2018). As interações bióticas são um dos principais componentes do cenário ecológico que influencia a evolução dos sistemas sexuais das plantas (Ashman 2002). As interações com polinizadores (Stone & Olson 2018), herbívoros (Ashman *et al.* 2004; Cole & Ashman 2005), patógenos (Collin *et al.* 2002) e/ou predadores de sementes (Collin *et al.* 2002; Boege & Domínguez 2008) podem reforçar ou restringir os benefícios do efeito compensatório feminino se os animais responderem, diferentemente, entre os tipos florais. Em *E. havanense*, as plantas brevistilas com esterilidade masculina tiveram maior produção de frutos e sementes, porém apresentaram uma maior taxa de sementes predadas, o que potencialmente reduziu a magnitude do efeito compensatório (Boege & Domínguez 2008). Nesta mesma espécie, os polinizadores parecem não ter um efeito sobre a compensação feminina, uma vez que a frequência de visitas entre os morfos florais foi igual (Domínguez *et al.* 1997).

A especialização sexual é um processo gradual e a presença de plantas brevistilas parcialmente masculinas-estéreis em espécies de *Erythroxylum* pode ser considerado um passo intermediário entre o hermafroditismo e a ginodioicia (Domínguez *et al.* 1997; Cuevas *et al.* 2005). Neste sentido, a esterilidade masculina morfo-tendenciosa não ocorre em todas espécies. Em um estudo relacionado, foi mostrado que a distilia parece ser um sistema floral estável em populações de *E. suberosum* A.St.-Hil. e *E. tortuosum* Mart., já que o nível de esterilidade dos grãos de pólen não varia entre os morfos (Matias R. dados do segundo capítulo). Diferente das populações com especialização sexual, espera-se que populações distílicas estáveis tenham

plantas brevistilas e longistilas com potencial reprodutivo equivalente (Thompson *et al.* 2003), uma vez que não existem pressões seletivas para uma compensação reprodutiva. Contudo, algumas exceções têm sido relatadas, de modo que plantas com especialização sexual feminina não têm uma compensação reprodutiva teoricamente necessária para sua persistência (Shykoff *et al.* 2003; Dufay & Billard 2012) e variações reprodutivas entre morfos ocorrem independente da especialização sexual (Zhu *et al.* 2015). A presença de espécies com e sem especialização sexual faz com que *Erythroxylum* seja um excelente modelo para testar se as diferenças reprodutivas entre morfos são resultado de uma compensação feminina.

O objetivo específico deste estudo foi analisar vários traços reprodutivos em espécies distílicas de *Erythroxylum*, verificando se a presença de uma possível especialização sexual está relacionada com a presença de alguma compensação reprodutiva. Para permitir um marco comparativo, foram estudadas quatro espécies. *Erythroxylum suberosum* e *E. tortuosum* não exibem especialização sexual e *E. campestre* e *E. deciduum* apresentam uma esterilidade masculina morfo-tendenciosa, de forma que as plantas brevistilas são parcialmente masculinas-estéreis, exibindo especialização sexual feminina. Dentro deste contexto, foram comparadas a fenologia reprodutiva, a produção de flores e frutos, e a qualidade dos frutos e sementes das plantas brevistilas e longistilas de cada espécie. Além disso, a frequência de polinizadores e predação de sementes também foram comparadas entre os morfos, uma vez que estes fatores ecológicos podem ter um efeito positivo, negativo, ou neutro na compensação reprodutiva. Sob o pressuposto de que haja uma compensação reprodutiva feminina relacionada com a especialização sexual, a hipótese do estudo é que variações entre morfos ocorram apenas em *E. campestre* e *E. deciduum*. Neste sentido, as plantas brevistilas apresentariam alguma vantagem reprodutiva sobre as longistilas, compensando a perda parcial da função sexual masculina.

METODOLOGIA

Área Estudada - O trabalho de campo foi realizado em uma área denominada “Fazenda Pé do Morro” (18°06’29” - 18°07’34”S e 47°59’33” - 48°00’15”O) localizada a sete quilômetros a noroeste da área urbana do município de Catalão, Goiás, Brasil Central. A área é de propriedade da Universidade Federal de Catalão, e têm aproximadamente 90 hectares, com altitude variando entre 718 a 830 m acima do nível do mar (Cardoso & Moreno 2013). A Fazenda Pé do Morro apresenta formações savânicas e florestais, além de áreas alteradas representadas, principalmente, por pastagem e, em menores porções, por agricultura e área minerada inativa

(Cardoso & Moreno 2013). As plantas estudadas estavam restritas a fitofisionomias savânicas, como campo sujo, cerrados ralo, típico e denso. O clima da região é marcadamente sazonal, com uma estação fria e seca de Maio a Setembro, e outra estação quente e chuvosa de Outubro a Abril (Köppen 1948); a precipitação média anual é de 1522 mm, com 88% da precipitação concentrada entre Outubro e Março, e a temperatura média anual é de 23 °C (Vieira *et al.* 2012).

Espécies estudadas - Foram estudadas quatro espécies morfológicamente distílicas de *Erythroxylum*, sendo *E. campestre*, *E. deciduum*, *E. suberosum* e *E. tortuosum*. Estas espécies ocorrem em alta densidade no Cerrado do Brasil Central, sendo *E. campestre* uma espécie subarbustiva, *E. suberosum* e *E. tortuosum* arbustivas e *E. deciduum* arbórea. Na área estudada, todas as populações são isopléticas, apresentando uma razão equilibrada de plantas brevistilas e longistilas (Matias R. dados do primeiro capítulo). A reciprocidade dos órgãos sexuais baixos (estigmas brevistilos e anteras longistilas) é maior que a dos órgãos altos (estigmas longistilos e anteras brevistilas) em todas as espécies, menos em *E. deciduum* (Matias R. dados do primeiro capítulo). *Erythroxylum campestre* é autocompatível, enquanto que as outras três espécies exibem um sistema de incompatibilidade auto e intramorfo, formando frutos apenas por cruzamentos intermorfos (Matias R. dados do segundo capítulo). As populações de *E. campestre* e *E. deciduum* estudadas na Fazenda Pé do Morro exibem uma maior esterilidade masculina nas flores brevistilas, indicando uma possível especialização sexual via ginodioiccia. Já *E. suberosum* e *E. tortuosum* não tiveram diferença entre morfos quanto a esterilidade dos grãos de pólen na mesma área, sugerindo que a distílica seja um sistema floral estável dentro destas duas espécies (Matias R. dados do segundo capítulo).

Fenologia reprodutiva e produção de flores e frutos - Em campo, foram selecionados, aleatoriamente, 25 indivíduos (9-Brevistilo e 16-Longistilo) de *E. campestre*, 20 (9-B e 11-L) de *E. deciduum*, 18 (9-B e 9-L) de *E. suberosum* e 20 (11-B e 9-L) de *E. tortuosum* para serem analisados quanto a fenologia de floração e frutificação. As observações fenológicas foram realizadas durante o período de maio de 2016 a abril de 2017, registrando a cada quinze dias a porcentagem de indivíduos de cada morfo que tinham flores abertas e frutos verdes ou maduros. Foram selecionados também entre 35 a 44 indivíduos de cada espécie (entre 15 a 28 indivíduos por morfo) para avaliar o número médio de flores abertas por dia. Para analisar o número total de frutos, foram selecionados entre 21 a 48 indivíduos por espécie (entre 10 a 27 indivíduos por morfo), sendo realizada a contagem direta do número de frutos formados por planta no final do período de frutificação, antes dos frutos serem dispersos. O número total de frutos e de flores abertas por dia foram analisados durante as estações reprodutivas do ano de 2016 e 2017. Para

investigar se o número de flores abertas por dia e o número total de frutos por planta varia entre os dois morfos e anos de coleta de cada espécie, foram usados modelos lineares generalizados (daqui em diante GLMs) usando a função *glm* com o pacote *lme4* (Bates *et al.* 2014). Nestes modelos, foram usados uma distribuição de poisson (após detectar superdispersão e corrigir os erros padrão usando modelos quasi-poisson; Zuur *et al.* 2009) e função *log*. Morfo floral e ano de coleta foram tratados como fatores fixos, incluído também a interação entre estes fatores.

Qualidade dos frutos - Com intuito de investigar diferenças na qualidade dos frutos entre os morfos, os seguintes aspectos foram analisados nas quatro espécies de *Erythroxylum* no ano de 2016: comprimento longitudinal do fruto, largura, biomassa fresca total e quantidade de açúcar na polpa. Para isso, foram coletados, aleatoriamente, de 27 a 104 frutos completamente maduros (frutos com coloração vermelha intensa) distribuídos em 13 a 32 indivíduos por espécie. A variação do número de frutos coletados foi em consequência da disponibilidade de frutos maduros para cada espécie. As medidas de comprimento longitudinal e largura foram determinados com auxílio de um paquímetro digital (erro = 0.01 mm). Após coletados, os frutos foram transportados imediatamente ao laboratório, sendo obtidos os valores de biomassa fresca total dos frutos (peso da polpa + semente) com auxílio de uma balança de precisão. Em seguida, foi retirado o suco da polpa de cada fruto para avaliar a porcentagem de açúcar presente na polpa utilizando um refratômetro de mão. Para analisar se houve diferenças entre os dois morfos de cada espécie em relação a cada característica investigada dos frutos, foram feitos modelos lineares de efeitos mistos (daqui em diante LMMs) usando a função *lmer* com o pacote *lme4* (Bates *et al.* 2014). Uma vez que foram avaliados de um a até cinco frutos por indivíduo, o indivíduo foi incluído como fator aleatório, controlando possíveis efeitos de variações individuais. Após realizar os modelos, foi utilizado o teste de razão de verossimilhança com o pacote *car* (Fox & Weisberg 2011) para obter o valor de P para a variável explicativa (morfo floral). Os valores de biomassa do fruto em *E. suberosum* e da proporção de açúcar na polpa em *E. tortuosum* foram transformados em log para melhorar a distribuição dos resíduos nos modelos.

Qualidade das sementes - Quanto à qualidade das sementes produzidas, as seguintes características foram analisadas nos diferentes morfos das quatro espécies de *Erythroxylum* no ano de 2016: comprimento longitudinal, largura, biomassa fresca, taxa de germinação e tempo inicial de germinação das sementes. Em campo, foram coletadas, aleatoriamente, de 27 a 103 sementes de frutos completamente maduros distribuídos em 13 a 32 indivíduos por espécie (entre uma a cinco sementes por indivíduo). Após coletadas, as sementes foram transportadas

ao laboratório para beneficiamento, mensurações morfométricas e germinação. O processo de beneficiamento constituiu na retirada manual da polpa do fruto e, posteriormente, assepsia por meio de imersão em hipoclorito de sódio (NaClO) a 1% durante um minuto e lavagem em água corrente por cerca de cinco minutos (Silva *et al.* 2008). O comprimento longitudinal e a largura das sementes foram determinados com auxílio de um paquímetro digital (erro = 0.01 mm) e a biomassa fresca foi obtida pela pesagem das sementes com balança de precisão. Para averiguar a biomassa fresca e a germinação, foram utilizadas apenas sementes que não estavam danificadas e sem nenhum sinal de predação (entre 11 a 63 sementes por espécie).

Para germinação, as sementes foram colocadas em diferentes Placas de Petri (cada uma com sementes de apenas um indivíduo) cobertas com duas folhas de papel filtro e umedecidas com água destilada. As sementes foram mantidas em câmara de germinação tipo B.O.D. (Biological Oxygen Demand) com fotoperíodo de 12 horas e em temperatura constante de 25°C. Foi analisada a proporção de germinação por indivíduo, calculando-se a quantidade de sementes que tiveram protrusão da radícula pela quantidade total de sementes utilizadas no experimento. As avaliações de germinação foram feitas, diariamente, até 50 dias após o início do experimento (após 40 dias nenhuma semente iniciou germinação). A partir destas avaliações diárias, o tempo inicial de germinação (em dias, desde o início do experimento até a protrusão da radícula) foi registrado para cada semente. Diferenças entre morfos em relação ao comprimento longitudinal, largura e biomassa fresca das sementes foram analisadas por meio de LMMs, com distribuição gaussiana. Após realizar estes modelos, um teste de razão de verossimilhança foi utilizado para obter o valor de P. Para as outras características das sementes, modelos lineares generalizados mistos (daqui em diante GLMMs) foram realizados usando a função *glmer* (pacote *lme4*; Bates *et al.* 2014), com distribuição binomial para a taxa de germinação, e como distribuição poisson para o tempo inicial de germinação. Em todos os modelos (LMMs e GLMMs) o morfo foi considerado fator fixo e os indivíduos foram incluídos como fator aleatório. Algumas análises estatísticas não foram realizadas para *E. deciduum* devido ao pequeno tamanho amostral.

Visitantes Florais - Em campo, observações do comportamento de forrageamento dos visitantes florais foram realizadas em diferentes dias durante o pico de floração de cada espécie no ano de 2016 para determinar os fatores que, possivelmente, influenciam no número de visitas. O horário das observações foram das 07:00 às 14:00 horas, pois após às 15:00 horas as flores murcham e a atividade dos visitantes diminui drasticamente. Entre este intervalo de tempo, foram realizadas sessões de observações de 30 minutos em cada indivíduo, sendo selecionadas 40 plantas (entre 16 a 24 indivíduos por morfo), acumulando um total de 20 horas

observadas para cada espécie. Em cada sessão de observação foi registrado o morfo floral (brevistilo ou longistilo), número de flores abertas no indivíduo, número de visitas, comportamento (polinizador ou pilhador) e identidade de cada visitante. Quando possível, os visitantes foram fotografados, capturados com auxílio de puçá e, posteriormente, identificados por especialistas. Para cada espécie, foi realizado um GLMM, modelado com uma distribuição de poisson, usando a função *log*, para analisar os fatores que influenciam no número de visitas por indivíduo. Nestes modelos, foram incluídas como variáveis explicativas, morfo, número de flores abertas e a interação entre estes dois fatores. Indivíduos foram incluídos como fator aleatório.

Predação de sementes - Para averiguar a taxa de predação das sementes em campo, foram coletadas, aleatoriamente, de 27 a 104 sementes distribuídas em 13 a 31 indivíduos (entre uma a cinco sementes por indivíduo) selecionados por espécie no ano de 2016. Após a coleta e o despulpamento dos frutos em laboratório, estas sementes foram analisadas quanto à presença ou ausência de predação, a partir do consumo do endosperma. Os predadores, comumente, consomem o endosperma das sementes, fazendo com que a predação seja facilmente estimada em espécies de *Erythroxylum* pois as sementes predadas apresentam uma consistência macia (Boege & Domínguez 2008). Outros indícios de predação, como a presença de qualquer orifício no tegumento das sementes também foram levados em consideração. Foi analisado se havia diferenças entre os morfos em relação a quantidade de sementes predadas de cada espécie através de GLMMs, com distribuição binomial usando a função *logit*. Nestes modelos, morfo floral foi considerado fator fixo e indivíduos foram incluídos como fator aleatório. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o programa R (R Core Team 2017).

RESULTADOS

Fenologia reprodutiva - Baseado em uma inspeção visual, não houve diferenças nítidas na intensidade de floração entre morfos dentro da mesma espécie que pudesse indicam um efeito compensatório nas plantas brevistilas (Fig. 1). As quatro espécies apresentaram sobreposição no período de floração e frutificação. De maneira geral, as plantas floresceram entre o período de julho a novembro, sendo que o tempo de floração de cada espécie variou de um mês e meio (*E. deciduum*) até quatro meses (*E. campestre* e *E. tortuosum*). Raramente, foram encontradas plantas brevistilas e/ou longistilas florescendo fora do período de julho a novembro. Frutos começaram a ser registrados de 15 a 45 dias após o início da floração de cada espécie. Embora

o tempo de frutificação de cada espécie tenha variado de três (*E. deciduum*) até oito meses (*E. campestre*), as quatro espécies tiveram pico de frutificação durante outubro-novembro (Fig. 1).

Produção de flores e frutos - *Erythroxylum campestre* e *E. deciduum*, que apresentam especialização sexual feminina no morfo brevistilo, não tiveram compensação reprodutiva no número de flores abertas diariamente ao longo do período de floração e no número total de frutos formados no final do período de frutificação, uma vez que não apresentaram diferenças entre os morfos (Tab. 1 e 2). Diferenças entre morfos também não foram registradas para *E. suberosum* e *E. tortuosum* quanto a estas características (Tab. 1 e 2). Mesmo que algumas espécies tenham apresentado variações entre anos de coleta, a ausência de significância estatística nos valores de interação mostra que não há diferença entre morfos independentemente do ano estudado para todas as espécies (Tab. 1 e 2).

Qualidade dos frutos e sementes - Em geral, os resultados indicaram que as características dos frutos e sementes avaliadas não demonstram variações entre morfos que possam indicar um efeito compensatório nas espécies. Em *E. campestre*, espécie com especialização sexual, foi encontrado um efeito significativo do morfo em duas características avaliadas quanto a qualidade das sementes (Tab. 3). Entretanto, isso, provavelmente, não está relacionada a um efeito compensatório do morfo brevistilo, pois foram as plantas longistilas que apresentaram sementes mais largas e maior rapidez na germinação das sementes. Por mais que as sementes longistilas germinem mais rápido, o sucesso de germinação entre o morfo brevistilo e longistilo não foi, estatisticamente, diferente para esta espécie (Tab. 3). Nenhuma diferença significativa entre os morfos foi encontrada para as variáveis estudadas nas outras três espécies, independentemente se apresentavam (*E. deciduum*) ou não (*E. suberosum* e *E. tortuosum*) especialização sexual (Tab. 3).

Visitantes Florais - As análises dos fatores que podem influenciar na taxa de visitação mostraram que houve diferenças no número de visitas entre morfos apenas em *E. deciduum* (Tab. 4), de modo que as plantas brevistilas receberam mais visitas por intervalo de tempo do que as plantas longistilas (Fig. 2). O número de flores abertas por indivíduo teve um efeito significativo no número de visitas de *E. deciduum* e *E. tortuosum*, mostrando que plantas com mais flores recebem mais visitas (Tab. 4). A interação entre morfo e número de flores abertas teve um efeito significativo no número de visitas de *E. suberosum* e *E. tortuosum* (Tab. 4).

A riqueza de visitantes florais, assim como o número total de visitas por indivíduo foi variável entre as espécies. Foram registradas um total de 75 espécies de visitantes nas quatro

Erythroxyllum, incluindo abelhas (30 spp.), vespas (27 spp.), borboletas (10 spp.) e moscas (8 spp.). A identificação desses insetos, juntamente com sua frequência relativa de visitas em cada espécie de *Erythroxyllum*, estão incluídas no Material Suplementar (Tab. S1). Indivíduos de *E. deciduum* foram os que receberam a maior riqueza de visitantes florais com 34 espécies (Fig. 3) e foram os mais visitados com média de 4.6 visitas por intervalo de 30 minutos. Já os indivíduos de *E. tortuosum*, foram os que receberam a menor riqueza de visitantes com 14 espécies (Fig. 3) e foram os menos visitados com média de 1.9 visitas por intervalo.

Em todas as *Erythroxyllum* estudadas, as abelhas são os principais visitantes florais em porcentagem total de visitas (> 65% das visitas) e em número de espécies visitantes (Fig. 3). *Megachile (Leptaclina) lactea* foi o visitante mais frequente em *E. campestre* (21.31% das visitas), *Apis mellifera* o principal visitante em *E. deciduum* (22.31% das visitas) e *Paratrigona lineata* o mais abundante em *E. suberosum* (18.18% das visitas) e *E. tortuosum* (31.03% das visitas; Tab. S1). O contato com os órgãos sexuais das flores pode indicar que todos os visitantes florais são polinizadores (Fig. 4). Entretanto, as espécies de moscas e algumas de abelhas (*Ceratinula* sp., *Trigonisca* sp. e *P. lineata*) possuem o tamanho corporal pequeno em relação as flores de *Erythroxyllum*, de modo que em algumas flores, elas podem não contatar os órgãos sexuais mais altos (antras brevistilas e estigmas longistilas; Fig. 4D).

Predação de sementes - A intensidade de predação de sementes por planta (proporção de sementes danificadas) mostrou uma notável variação entre as espécies. *Erythroxyllum deciduum* (média de 0.43 ± 0.45 sementes) e *E. suberosum* (0.43 ± 0.35 sementes) foram as espécies que tiveram mais sementes predadas, seguidas por *E. campestre* (0.09 ± 0.27 sementes) e *E. tortuosum* (0.08 ± 0.24 sementes). Embora tenha apresentado uma certa variação entre as espécies, a intensidade de sementes predadas não foi diferente entre as plantas brevistilas e longistilas dentro de uma mesma espécie (Tab. 5).

DISCUSSÃO

Neste estudo, foram feitas comparações entre plantas brevistilas e longistilas de quatro espécies de *Erythroxyllum* quanto aos polinizadores, predação de sementes e várias outras características reprodutivas. Como esperado, os resultados mostraram que para as espécies que não apresentam uma especialização sexual (*E. suberosum* e *E. tortuosum*), os morfos florais não diferem, significativamente, em nenhum parâmetro reprodutivo examinado. No entanto,

apesar de diferenças entre morfos ocorrerem nas espécies com especialização sexual (*E. campestre* e *E. deciduum*), nenhuma das variações encontradas evidenciam uma compensação reprodutiva feminina das plantas brevistilas. Assim, os recursos economizados pela menor produção de grãos de pólen viáveis, possivelmente, não são redirecionados para um maior desempenho reprodutivo feminino das plantas brevistilas. Em *E. campestre*, contrariamente ao esperado, as sementes longistilas são mais largas e germinam mais rápidas do que as brevistilas. Já em *E. deciduum*, as plantas brevistilas são mais visitadas pelos polinizadores do que as longistilas, porém isso não acarretou em uma maior produção de frutos em plantas brevistilas, não levando a uma compensação reprodutiva deste morfo.

Estudos com meta-análise (Shykoff *et al.* 2003) e de revisão (Dufay & Billard 2012) mostraram que a maioria das espécies ginodióicas investigadas tiveram evidências de compensação feminina em pelo menos uma característica reprodutiva estudada. Os resultados destes estudos se encaixam nas previsões teóricas de que mutações responsáveis pela esterilidade masculina deveriam se beneficiar de uma melhor transmissão através da aptidão feminina para invadir populações hermafroditas (Lewis 1941; Frank 1989; Gouyon *et al.* 1991; Bailey *et al.* 2003; Dufay *et al.* 2007). No entanto, nenhuma possível compensação reprodutiva mensurada foi encontrada nas plantas brevistilas de *E. campestre* e *E. deciduum*. Estes resultados também contrastaram com estudos realizados com a cogenérica *E. havanense*, no qual as plantas brevistilas apresentaram vantagens reprodutivas significativas sobre as longistilas (Avila-Sakar & Domínguez 2000; Rosas *et al.* 2005). No entanto, a esterilidade masculina das plantas brevistilas de *E. havanense* é mais pronunciada, havendo populações com plantas completamente estéreis (Rosas *et al.* 2005). Embora algumas espécies estudadas aqui tenham apresentado diferenças na produção de flores e/ou frutos entre 2016 e 2017, a ausência de diferenças entre morfos em todas espécies, independente do ano, sugere que a falta de compensação reprodutiva é uma característica constante dentro das populações.

A compensação feminina é encontrada na maioria, mas não em todas as populações ginodióicas (e.g. Alonso & Herrera 2001; Shykoff *et al.* 2003; García *et al.* 2005; Dufay *et al.* 2010; Dufay & Billard 2012). Desta forma, embora a compensação feminina possa ser uma condição suficiente para a manutenção de indivíduos femininos, esta condição não é necessária, uma vez que a compensação nem sempre é detectada em populações com alta frequência de esterilidade masculina (ver Alonso & Herrera 2001; García *et al.* 2005). Em alguns casos, a falta de compensação feminina pode estar relacionada com um número restrito de características reprodutivas investigadas (Dufay & Billard 2012). No entanto, em *Beta vulgaris*

L. (Amaranthaceae; Dufay *et al.* 2009), *Plantago maritima* L. (Plantaginaceae; Dinnetz & Jerling 1997) e *Raphanus sativus* L. (Brassicaceae; Murayama *et al.* 2004; Miyake *et al.* 2009) nenhuma compensação foi registrada mesmo investigando inúmeros traços reprodutivos. A falta de compensação ocorreu também em populações ginodióicas de *Daphne laureola* L. (Thymelaeaceae; Alonso & Herrera 2001), tanto nos aspectos relacionados a fecundidade quanto no desempenho vegetativo. Nestas espécies, assim como em *E. campestre* e *E. deciduum*, outros mecanismos parecem estar envolvidos na manutenção de indivíduos com esterilidade masculina.

A isoplelia nas populações estudadas (Matias R. dados do primeiro capítulo) indicam pressões de seleção favoráveis a manutenção dos dois morfos, sendo necessárias alternativas para explicar como um genótipo de esterilidade masculina pode invadir e persistir nas plantas brevistilas sem haver um efeito compensatório. Para alguns autores (Dufay & Billard 2012), parece improvável que indivíduos com esterilidade masculina sejam mantidos nas populações sem se beneficiar de uma vantagem seletiva e, assim, depender apenas de mutações que seriam mantidas por processos estocásticos. Espécies com esterilidade masculina nuclear-citoplasmática, como as *Erythroxylum* (Domínguez *et al.* 1997; Del-Carlo & Buzato 2006), teoricamente necessitam de uma compensação feminina muito baixa para manter as plantas masculinas-estéreis em alta frequência (Gouyon *et al.* 1991; Dufay *et al.* 2007), sendo difícil detectar, estatisticamente, qualquer efeito. Embora não tenha exibido diferença significativa, a qualidade dos frutos e sementes das plantas brevistilas de *E. deciduum* são melhores do que as longistilas em todos os parâmetros avaliados. Porém, o número amostral para esta espécie foi reduzido devido poucos frutos terem chegado a fase final de maturação. Uma outra hipótese provável é que a compensação feminina possa ocorrer em alguma característica de aptidão que não foi investigada.

Uma variação contrária ao esperado para a compensação feminina foi encontrada em *E. campestre*. Sementes brevistilas foram menores e demoraram mais para germinar do que as longistilas, sugerindo uma maior depressão endogâmica. A princípio, a tendência era que os dois morfos tivessem níveis semelhantes de depressão endogâmica, uma vez que *E. campestre* é autocompatível (Matias R. dados do primeiro capítulo). Para que estas variações na qualidade das sementes sejam resultado de diferenças no nível de depressão endogâmica, sugere-se que haja uma competição gametofítica mais acentuada nas flores longistilas. Estudos com espécies heterostílicas autocompatíveis, como *Eichhornia paniculata* (Spreng.) Solms (Pontederiaceae), mostraram que o crescimento dos tubos polínicos legítimos é mais rápido do que os ilegítimos

independente do morfo (McKenna 1992; Cruzan & Barrett 2016). Entretanto, devido a maior distância que os tubos polínicos devem percorrer, espera-se que a seleção gametofítica tenha uma maior oportunidade de ocorrer nos estiletos longos (McKenna 1992). Assim, mesmo que a polinização legítima aconteça após a ilegítima nas flores longistilas, o tubo polínico legítimo pode chegar primeiro no óvulo. Os estiletos curtos das flores brevistilas podem reduzir estas chances e, conseqüentemente, ter maior taxa de autofecundação e depressão endogâmica.

As plantas brevistilas de *E. deciduum* são mais visitadas do que as longistilas e embora esta variação indique que os polinizadores possam ter potencial para levar a uma compensação feminina, a quantidade e qualidade de frutos e sementes formadas não diferiu entre os morfos. Um estudo realizado na mesma área mostrou que dentre as *Erythroxylum* estudadas, apenas *E. deciduum* não apresenta limitação polínica (Matias R. dados do primeiro capítulo). Assim, por mais que a taxa de visitas seja diferente, os dois morfos têm produção máxima de frutos. Flores de *Erythroxylum* possuem apenas um óvulo funcional (Loiola *et al.* 2007; Silva *et al.* 2016) e um número mínimo de visitas e grãos de pólen compatíveis depositado nos estigmas pode ser suficiente para que a polinização tenha sucesso. Os indivíduos de *E. deciduum* foram os que receberam mais visitas e, desta forma, a falha de polinização deve ser baixa em ambos os morfos. O alto número de visitas pode ter sido influenciado pelo florescimento sincronizado dos indivíduos e grande quantidade de flores abertas. O tamanho da exposição floral é um dos principais fatores que influenciam a atração e o comportamento dos polinizadores (Ashman 2000; Ashman & King 2005). Contudo, o tamanho da exposição floral não explica a preferência dos polinizadores pelas flores brevistilas, uma vez que não existe diferença entre morfos quanto ao tamanho das pétalas, número de flores abertas por dia, e intensidade e padrão de floração.

Espécies de *Erythroxylum* apresentam uma variedade de estratégias reprodutivas e dependendo das condições, a distília pode ser um sistema evolutivamente estável, ou evoluir para homostilia, agamospermia, ginodioicia ou para dioicia (Bawa & Opler 1975; Ganders 1979; Berry *et al.* 1991; Barros 1998; Pailler *et al.* 1998; Cuevas *et al.* 2005; Rosas *et al.* 2005). A ausência de diferenças significativas entre morfos quanto as características reprodutivas investigadas nas populações de *E. suberosum* e *E. tortuosum* sugerem a estabilidade do sistema distílico nestas duas espécies. A ocorrência de incompatibilidade auto e intramorfo, populações isopléticas e ausência de esterilidade masculina morfo-tendenciosa (Barros 1998; Del-Carlo & Buzato 2006; Matias R. dados do primeiro e segundo capítulo) reforçam a ideia de que não há movimento em direção a especialização sexual ou autofecundação. Del-Carlo & Buzato (2006), estudando uma população de *E. suberosum*, registraram formação de estaminódios em algumas

flores brevistilas e longistilas, o que não ocorre nas populações estudadas aqui. Apesar da formação de estaminódios, estes autores (Del-Carlo & Buzato 2006) também consideraram o sistema distílico como estável em *E. suberosum*, pois a esterilidade masculina ocorre em baixa frequência em ambos os morfos, e não há compensação reprodutiva para a perda da função masculina dentro dos indivíduos.

Os resultados deste estudo sugerem que a especialização sexual em *E. campestre* e *E. deciduum* não está diretamente relacionada com a presença de uma compensação reprodutiva e, atualmente, não se sabe qual mecanismo mantém as plantas com esterilidade masculina nestas populações. Embora tenha sido avaliado as principais características nas quais a compensação feminina pode aparecer (ver Shykoff *et al.* 2003; Dufay & Billard 2012), uma possível vantagem na aptidão das plantas brevistilas pode acontecer em estágios posteriores do ciclo reprodutivo, após a germinação. Observações de emergência e sobrevivência de plântulas são necessárias para inferir com confiança a ausência de um efeito compensatório feminino. Além destes traços, muitos outros, como a sobrevivência de adultos, probabilidade de floração e idade na primeira floração, raramente são investigados (Dufay & Billard 2012). Em espécies perenes, como é o caso das *Erythroxylum*, um melhor desempenho através de uma destas características pode aumentar a produção de sementes ao longo da vida (ver Morris & Doak 1998 para um exemplo em *Silene acaulis* (L.) Jacq.). A esterilidade masculina apenas parcial e a aparente falta de compensação feminina nas plantas brevistilas de *E. campestre* e *E. deciduum*, poderiam ser interpretadas como evidência de uma origem evolutiva relativamente recente em direção a ginodioicia. No entanto, a falta de uma compensação reprodutiva pode representar uma restrição à evolução da especialização sexual.

REFERÊNCIAS

- Alonso, C. & Herrera, C.M. 2001. Neither vegetative nor reproductive advantages account for high frequency of male-steriles in southern Spanish gynodioecious *Daphne laureola* (Thymelaeaceae). *American Journal of Botany* 88: 1016-1024.
- Ashman, T.L. 2000. Pollinator selectivity and its implications for the evolution of dioecy and sexual dimorphism. *Ecology* 81: 2577-2591.
- Ashman, T.L. 2002. The role of herbivores in the evolution of separate sexes from hermaphroditism. *Ecology* 83: 1175-1184.

- Ashman, T.L.; Cole, D.H. & Bradburn, M. 2004. Sex-differential resistance and tolerance to herbivory in a gynodioecious wild strawberry. *Ecology* 85: 2550-2559.
- Ashman, T.L. & King, E.A. 2005. Are flower-visiting ants mutualists or antagonists? A study in a gynodioecious wild strawberry. *American Journal of Botany* 92: 891-895.
- Avila-Sakar, G. & Domínguez, C.A. 2000. Parental effects and gender specialization in a tropical heterostylous shrub. *Evolution* 54: 866-877.
- Bailey, M.F.; Delph, L.F. & Lively, C.M. 2003. Modeling gynodioecy: novel scenarios for maintaining polymorphism. *American Naturalist* 161: 762-776.
- Barros, M.G. 1998. Sistemas de polinização em espécies simpátricas de *Erythroxylum* P. Br. (Erythroxylaceae) do Brasil. *Brazilian Journal of Botany* 21: 159-166.
- Bates, D.; Maechler, M.; Bolker, B. & Walker, S. 2014. lme4: Linear mixed-effects model using Eigen and S4. R package version 1.1-6. Disponível em: <http://CRAN.R-project.org/package=lme4>
- Bawa, K.S. & Opler, P.A. 1975. Dioecism in tropical forest trees. *Evolution* 29: 167-179.
- Bawa, K.S. 1980. Evolution of dioecy in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 11:15-39.
- Bawa, K.S. & Beach, J.H. 1981. Evolution of sexual systems in flowering plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 68: 254-274.
- Berry, P.E.; Tobe, H. & Gómez, J.A. 1991. Agamospermy and the loss of distyly in *Erythroxylum undulatum* (Erythroxylaceae) from northern Venezuela. *American Journal of Botany* 78: 595-600.
- Boege, K. & Domínguez, C.A. 2008. Pre-dispersal seed predation reduces the reproductive compensatory advantage of thrum individuals in *Erythroxylum havanense* (Erythroxylaceae). *Evolutionary Ecology* 22: 675-687.
- Campbell, D. 2000. Experimental tests of sex-allocation theory in plants. *Trends in Ecology & Evolution* 15: 227-232.

- Cardoso, E. & Moreno, M.I.C. 2013. Considerações sobre aspectos da vegetação na Fazenda Pé do Morro, da Universidade Federal de Goiás, Campus Catalão. *Brazilian Geographical Journal: Geosciences and Humanities research medium* 4: 169-180.
- Charlesworth, D. 1981. A further study of the problem of the maintenance of females in gynodioecious species. *Heredity* 46: 27-39.
- Charlesworth, B. & Charlesworth, D. 1978. A model for the evolution of dioecy and gynodioecy. *American Naturalist* 112: 975-997.
- Charlesworth, D. & Charlesworth, B. 1981. Allocation of resources to male and female functions in hermaphrodites. *Biological Journal of the Linnean Society* 15: 57-74.
- Charnov, E. 1982. *The Theory of Sex Allocation*. Princeton University Press, Princeton, NJ.
- Cole, D.H. & Ashman, T.L. 2005. Sexes show differential tolerance to spittlebug damage and consequences of damage for multi-species interactions. *American Journal of Botany* 92: 1708-1713.
- Collin, C.; Pennings, P.; Rueffler, C.; Widmer, A. & Shykoff, J. 2002. Natural enemies and sex: how seed predators and pathogens contribute to sex-differential reproductive success in a gynodioecious plant. *Oecologia* 131: 94-102.
- Cruzan, M.B. & Barrett, S.C.H. 2016. Postpollination discrimination between self and outcross pollen covaries with the mating system of a self-compatible flowering plant. *American Journal of Botany* 103: 568-576.
- Cuevas, G.E.; Molina-Freaner, F.; Eguiarte, L.E. & Domínguez, C.A. 2005. Patterns of male sterility within and among populations of the distylous shrub *Erythroxylum havanense* (Erythroxylaceae). *Plant Ecology* 176: 165-172.
- Del-Carlo, S. & Buzato, S. 2006. Male sterility and reproductive output in distylous *Erythroxylum suberosum* (Erythroxylaceae). *Biological Journal of the Linnean Society* 88: 465-474.
- Delph, L.F.; Bailey, M.F. & Marr, D.L. 1999. Seed provisioning in gynodioecious *Silene acaulis* (Caryophyllaceae). *American Journal of Botany* 86:140-144.

- Dinnézt, P. & Jerling, L. 1997. Gynodioecy in *Plantago maritima* L.; no compensation for loss of male function. *Plant Biology* 46: 193-206.
- Domínguez, C.A.; Avila-Sakar, G.; Vizquez-Santana, S. & Mairquez-Guzmain, J. 1997. Morph-biased male sterility in the tropical distylous shrub *Erythroxyllum havanense* (Erythroxyllaceae). *American Journal of Botany* 84: 626-632.
- Dufay, M.; Touzet, P.; Maurice, S. & Cuguen, J. 2007. Modelling the maintenance of male-fertile cytoplasm in a gynodioecious population. *Heredity* 99: 349-356.
- Dufay, M.; Cuguen, J.; Arnaud, J.F. & Touzet, P. 2009. Sex ratio variation among gynodioecious populations in sea beet: can it be explained by negative frequency-dependent selection? *Evolution* 63: 1483-1497.
- Dufay, M.; Lahiani, E. & Brachi, B. 2010. Gender variation and inbreeding depression in gynodioecious-gynomonoecious *Silene nutans* (Caryophyllaceae). *International Journal of Plant Sciences* 171: 53-62.
- Dufay, M. & Billard, E. 2012. How much better are females? The occurrence of female advantage, its proximal causes and its variation within and among gynodioecious species. *Annals of Botany* 109: 505-519.
- Fox, J. & Weisberg, S. 2011. An {R} companion to applied regression. 2nd ed. Sage Publications, Los Angeles.
- Frank, S.A. 1989. The evolutionary dynamics of cytoplasmic malesterility. *American Naturalist* 133: 345-376.
- Ganders, F.R. 1979. Heterostyly in *Erythroxyllum coca* (Erythroxyllaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 78: 11-20.
- García, E.C; Márquez, G.J.; Domínguez, C.A. & Molina-Freaner, F. 2005. Evidence of gynodioecy in *Kallstroemia grandiflora* (Zygophyllaceae): microsporogenesis in hermaphrodite and female plants and lack of reproductive compensation. *International Journal of Plant Sciences* 166: 481-491.
- Gouyon, P.H. & Couvet, D. 1987. A conflict between two sexes, females and hermaphrodites. In: Stearns, S.C. (ed.) *The evolution of sex and its consequences*. Birkhauser, Basel, Switzerland. p. 245-261.

- Gouyon, P-H.; Vichot, F. & van Damme, J.M.M. 1991. Nuclear-cytoplasmic male sterility: Single point equilibria versus limit cycles. *American Naturalist* 137: 498-514.
- Köppen, W. 1948. *Climatologia: Un estudio de los climas de La Tierra*. Fondo de Cultura Económica, México.
- Lewis, D. 1941. Male sterility in natural populations of hermaphrodite plants. *New Phytologist* 40: 56-63.
- Loiola, M.I.B.; Agra, M.F.; Baracho, G.S. & Queiroz, R.T. 2007. Flora da Paraíba, Brasil: Erythroxylaceae Kunth. *Acta Botanica Brasilica* 21: 473-487.
- Marshall, M. & Ganders, F.R. 2001. Sex-biased seed predation and the maintenance of females in a gynodioecious plant. *American Journal of Botany* 88: 1437-1443.
- McKenna, M.A. 1992. Pollen competition in heterostylous plants. In: Barrett S.C.H. (ed.) *Evolution and function of heterostyly*. Springer, Berlin, Heidelberg. p. 225-246.
- Miyake, K.; Miyake, T.; Terachi, T.; Yahara, T. 2009. Relative fitness of females and hermaphrodites in a natural gynodioecious population of wild radish, *Raphanus sativus* L. (Brassicaceae): comparison based on molecular genotyping. *Journal of Evolutionary Biology* 22: 2012-2019.
- Morris, W.F. & Doak, D.F. 1998. Life history of the long-lived gynodioecious cushion plant *Silene acaulis* (Caryophyllaceae), inferred from size-based population projection matrices. *American Journal of Botany* 85: 784-793.
- Murayama, K.; Yahara, T. & Terachi, T. 2004. Variation of female frequency and cytoplasmic male-sterility gene frequency among natural gynodioecious populations of wild radish (*Raphanus sativus* L.). *Molecular Ecology* 13: 2459-2464.
- Pailler, T.; Humeau, L. & Thompson, J.D. 1998. Distyly and heteromorphic incompatibility in oceanic island species of *Erythroxylum* (Erythroxylaceae). *Plant Systematics and Evolution* 213: 187-198.
- R Core Team. 2017. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

- Ramsey, M. & Vaughton, G. 2002. Maintenance of gynodioecy in *Wurmbea biglandulosa* (Colchicaceae): gender differences in seed production and progeny success. *Plant Systematics and Evolution* 232: 189-200.
- Rosas, L.F.; Pérez-Alquicira, J. & Domínguez, C.A. 2005. Environmentally induced variation in fecundity compensation in the morph-biased male-sterile distylous shrub *Erythroxyllum havanense* (Erythroxyllaceae). *American Journal of Botany* 92: 116-122.
- Ross, M.D. & Gregorius, H.R. 1985. Selection with gene-cytoplasm interactions. II. Maintenance of gynodioecy. *Genetics* 109: 427-439.
- Silva, B.M.S.; Cesarino, F.; Sader, R. & Lima, J.D. 2008. Germinação e armazenamento de sementes de coca (*Erythroxyllum ligustrinum* DC. - Erythroxyllaceae). *Revista Brasileira de Sementes* 30: 25-29.
- Silva, L.; Fernandes, C.L.; Simão, E. & Nakamura, A.T. 2016. Development of anthers and pollen in Brazilian heterostylic species of *Erythroxyllum* (Erythroxyllaceae): an ecological approach. *Pakistan Journal of Botany* 48: 2047-2055.
- Shykoff, J.A.; Kolokotronis, S.; Collin, C.L. & López-Villavicencio, M. 2003. Effects of male sterility on reproductive traits in gynodioecious plants: a meta-analysis. *Oecologia* 135: 1-9.
- Stone, J.D. & Olson, M.S. 2018. Pollination context alters female advantage in gynodioecious *Silene vulgaris*. *Journal of Evolutionary Biology* 31: 111-122.
- Thomson, J.D. & Barrett, C.H. 1981. Temporal variation of gender in *Aralia hispida* Vent. (Araliaceae). *Evolution* 35: 1094-1107.
- Thompson, J.D.; Barrett, S.C.H. & Baker, A.M. 2003. Frequency-dependent variation in reproductive success in *Narcissus*: implications for the maintenance of stigma-height dimorphism. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 270: 949-953.
- Thomson, J.D. & Brunet, J. 1990. Hypotheses for the evolution of dioecy in seed plants. *Trends in Ecology & Evolution* 5: 11-16.
- Van Damme, J.M.M. & Van Damme, R. 1986. On the maintenance of gynodioecy: Lewis' result extended. *Journal of Theoretical Biology* 121: 339-350.

- Van der Meer, S.; Sebrechts, T.; Vanderstraeten, S. & Jacquemyn, H. 2017. The female advantage in natural populations of gynodioecious *Plantago coronopus*: seed quantity vs. offspring quality. *Oecologia* 185: 653-662.
- Van de Paer, C.; Saumitou-Laprade, P.; Vernet, P. & Billiard, S. 2015. The joint evolution and maintenance of self-incompatibility with gynodioecy or androdioecy. *Journal of Theoretical Biology* 371: 90-101.
- Vieira, D.L.M.; Coutinho, A.G. & da Rocha, G.P.E. 2012. Resprouting ability of dry forest tree species after disturbance does not relate to propagation possibility by stem and root cuttings. *Restoration Ecology* 21: 305-311.
- Zhu, X.-F.; Jiang, X.-F.; Li, L.; Zhang, Z.-Q. & Li, Q.-J. 2015. Asymmetrical disassortative pollination in a distylous primrose: the complementary roles of bumblebee nectar robbers and syrphid flies. *Scientific Reports* 5: 7721.
- Zuur, A.F.; Ieno, E.N.; Walker, N.J.; Saveliev, A.A. & Smith, G.M. 2009. *Mixed Effects Models and Extensions in Ecology with R*. Springer, New York, NY.

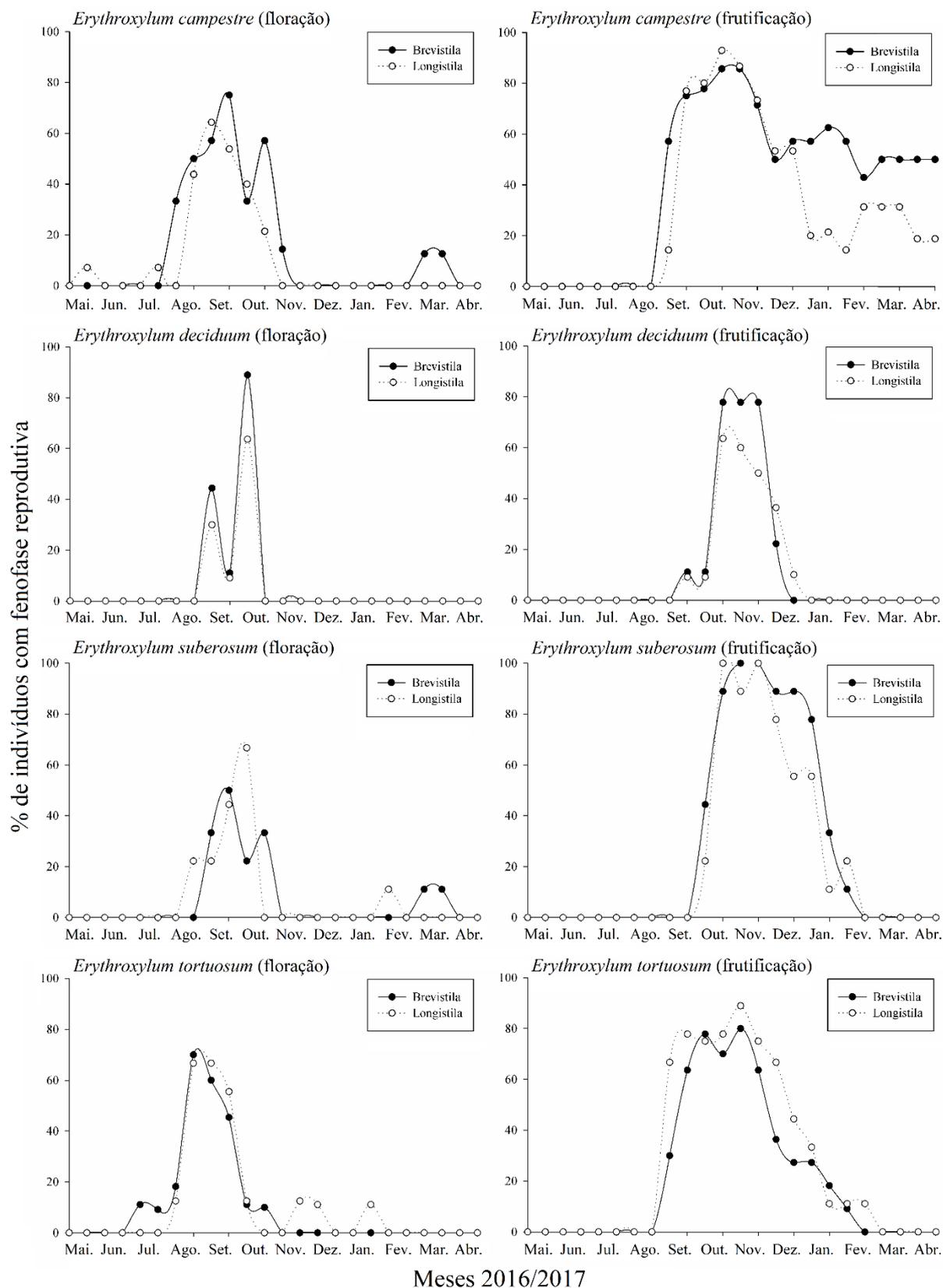


Figura 1. Fenologia de floração e frutificação em plantas brevistilas e longistilas de quatro espécies de *Erythroxylum* durante o período de maio de 2016 a abril de 2017 em uma área de Cerrado no Brasil Central.

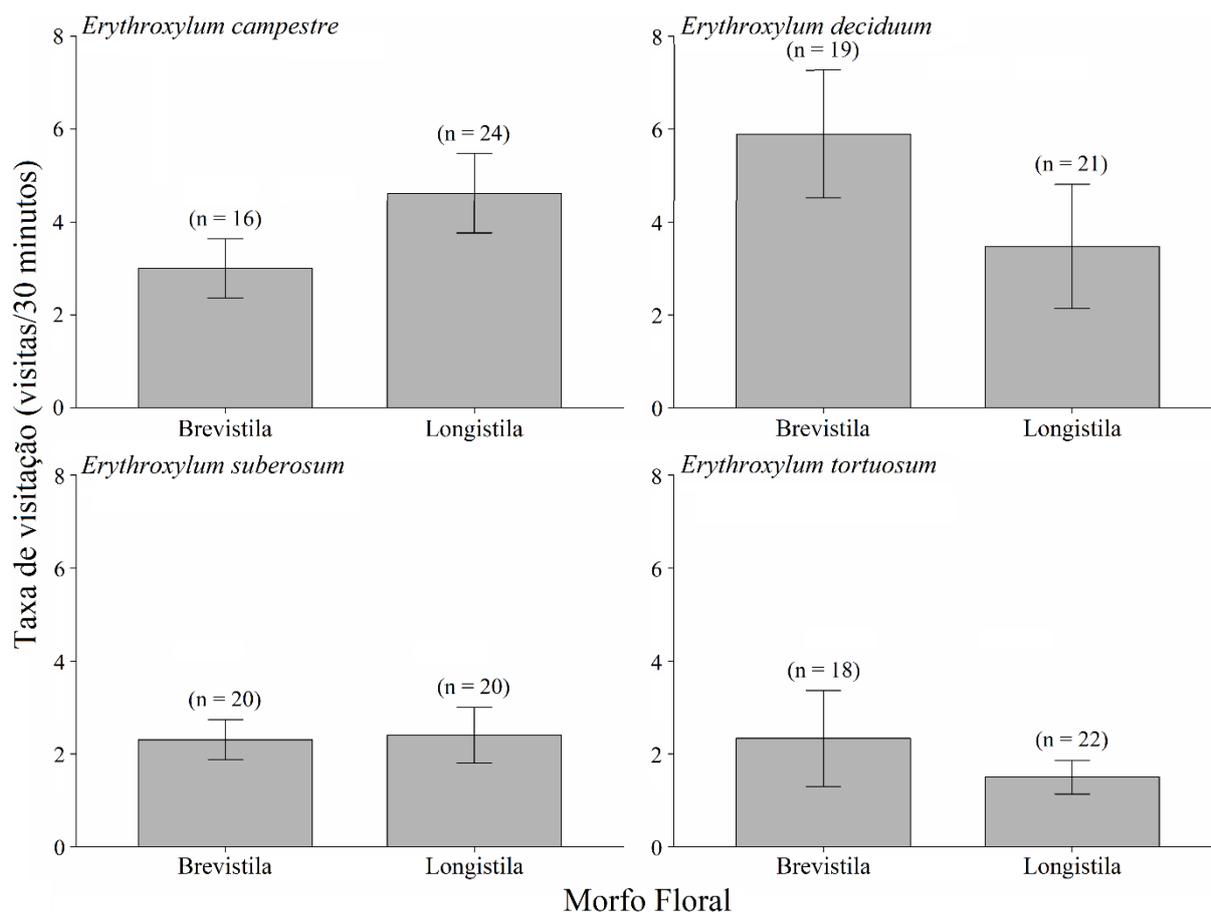


Figura 2. Frequência de visitação (número de visitas em intervalos de 30 minutos) em plantas brevistilas e longistilas de quatro espécies de *Erythroxylum* em uma área de Cerrado do Brasil Central. Os resultados são mostrados em média e erro padrão. O número de indivíduos e intervalos de tempo amostrados estão entre parênteses. *Erythroxylum deciduum* foi a única espécie que apresentou variação na taxa de visitação entre os morfos florais ($Z = 2.366$; d.f. = 1; $P = 0.018$).

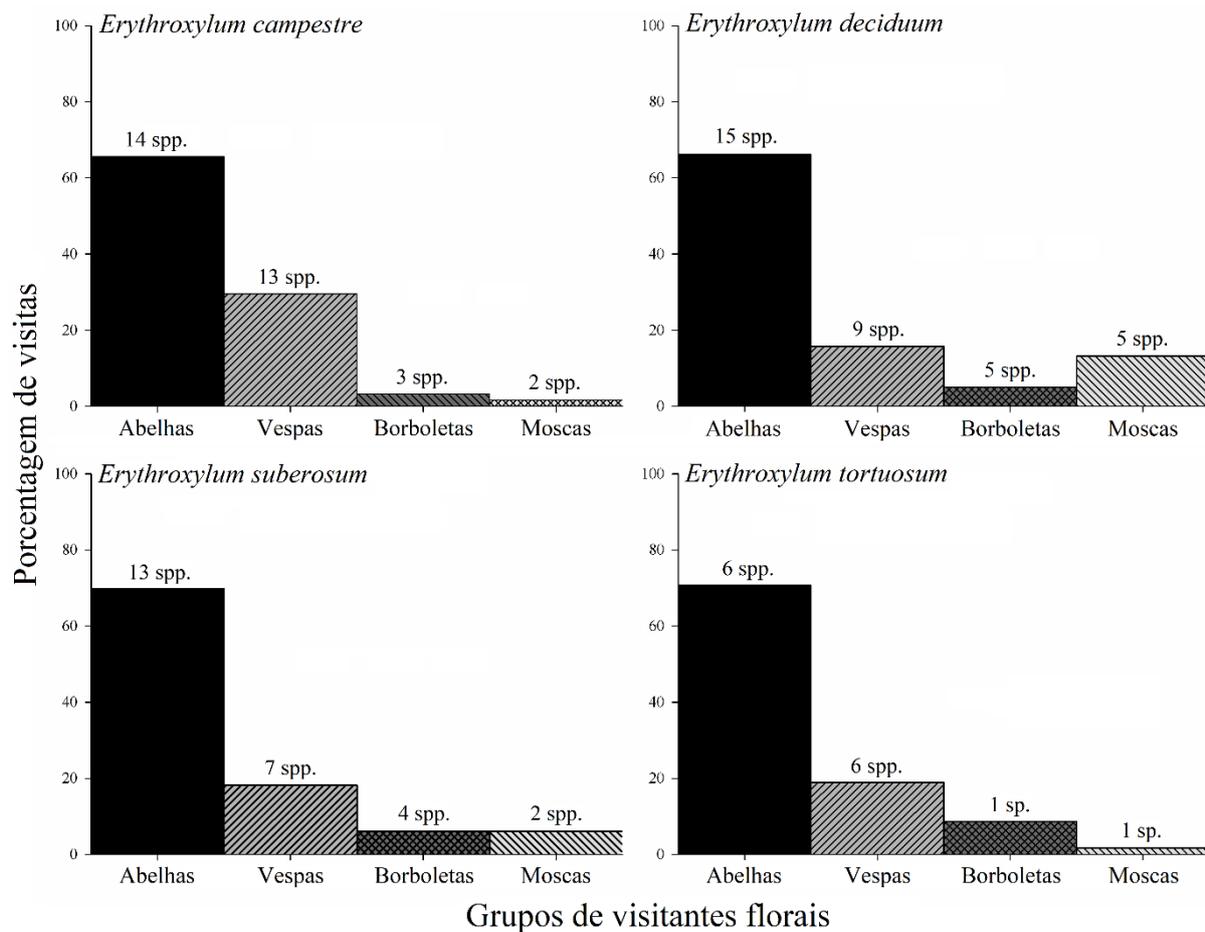


Figura 3. Porcentagem de visitas realizadas por diferentes grupos de visitantes florais em indivíduos de quatro espécies distílicas de *Erythroxylum* em uma área de Cerrado no Brasil Central. O número de espécies de cada grupo de visitante também é mostrado acima de cada barra.

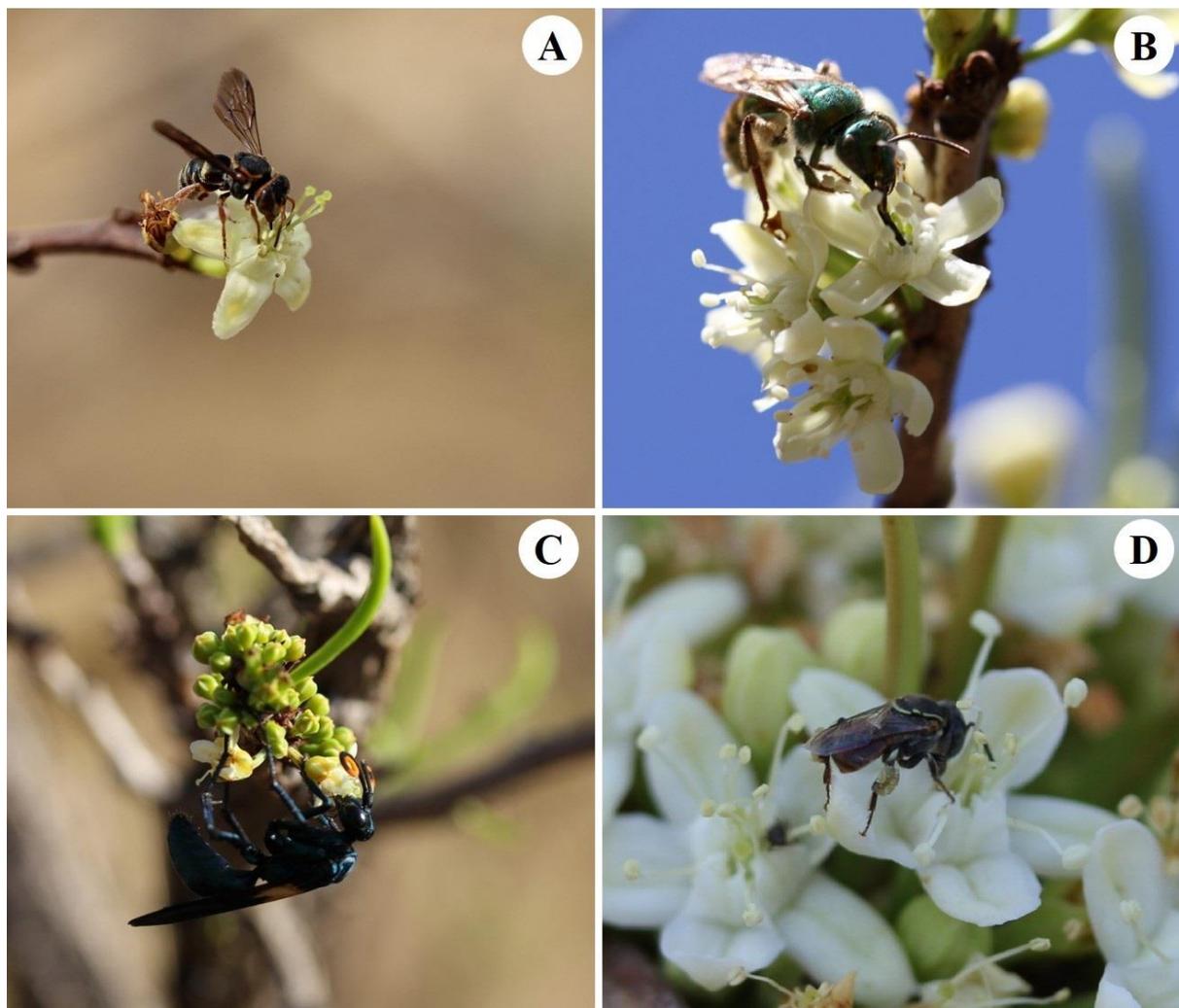


Figura 4. Algumas abelhas e vespas visitantes florais de quatro espécies de *Erythroxylum* em uma área de Cerrado no Brasil Central. **A:** Flor longistila de *E. campestre* visitada por espécie de Megachilidae. **B:** Flor brevistila de *E. deciduum* visitada por *Augochloropsis* cf. *smithiana* (Halictidae). **C:** Flor longistila de *E. suberosum* visitada por *Pepsis* sp. (Pompilidae). **D:** Flor brevistila de *E. tortuosum* visitada por *Paratrigona lineata* (Apidae).

Tabela 1. Valores médios (\pm desvio padrão) do número de flores abertas por dia e da quantidade total de frutos formados naturalmente durante dois anos em plantas brevistilas e longistilas de quatro espécies de *Erythroxylum* em uma área de Cerrado do Brasil Central. Entre parênteses são mostrados a quantidade de indivíduos amostrados.

Espécie/Ano	Número de flores abertas por dia		Número total de frutos produzidos	
	Brevistila	Longistila	Brevistila	Longistila
<i>Erythroxylum campestre</i>				
2016	3.25 \pm 2.44 (16)	5.67 \pm 6.38 (24)	37.00 \pm 31.02 (18)	39.33 \pm 55.79 (27)
2017	2.28 \pm 2.54 (16)	4.11 \pm 3.63 (28)	37.17 \pm 38.52 (18)	38.91 \pm 59.47 (22)
<i>Erythroxylum deciduum</i>				
2016	48.63 \pm 60.39 (19)	56.43 \pm 101.83 (21)	31.24 \pm 69.42 (17)	11.70 \pm 19.22 (23)
2017	53.00 \pm 75.48 (15)	35.85 \pm 53.89 (20)	232.27 \pm 295.65 (11)	317.88 \pm 460.54 (16)
<i>Erythroxylum suberosum</i>				
2016	16.70 \pm 23.84 (20)	24.65 \pm 46.80 (20)	77.13 \pm 148.51 (23)	80.00 \pm 108.13 (20)
2017	29.44 \pm 53.33 (18)	29.30 \pm 48.27 (23)	294.18 \pm 391.70 (11)	173.10 \pm 291.98 (10)
<i>Erythroxylum tortuosum</i>				
2016	25.89 \pm 37.08 (18)	10.14 \pm 8.05 (22)	46.67 \pm 107.58 (24)	7.96 \pm 10.05 (24)
2017	80.80 \pm 102.98 (20)	63.00 \pm 122.07 (20)	563.25 \pm 1036.12 (20)	327.17 \pm 520.68 (18)

Tabela 2. Resultados das análises dos modelos lineares generalizados (distribuição de erro quasi-poisson) averiguando os efeitos do morfo, ano de coleta e suas interações no número de flores abertas por dia e no número total de frutos produzidos por indivíduo em quatro espécies de *Erythroxylum* em uma área de Cerrado do Brasil Central. Os valores em negrito representam diferenças estatisticamente significativas.

Espécie/Fonte de variação	Flores abertas por dia			Total de frutos produzidos		
	<i>t</i>	d.f	P	<i>t</i>	d.f	P
<i>Erythroxylum campestre</i>						
Morfo	1.722	1	0.089	0.156	1	0.876
Ano de coleta	0.359	1	0.721	0.010	1	0.992
Ano de coleta x Morfo	0.373	1	0.710	0.027	1	0.978
<i>Erythroxylum deciduum</i>						
Morfo	0.318	1	0.752	0.801	1	0.426
Ano de coleta	0.167	1	0.868	2.566	1	0.013
Ano de coleta x Morfo	0.748	1	0.457	1.005	1	0.319
<i>Erythroxylum suberosum</i>						
Morfo	0.637	1	0.526	0.060	1	0.952
Ano de coleta	0.941	1	0.349	2.566	1	0.013
Ano de coleta x Morfo	0.499	1	0.619	0.705	1	0.484
<i>Erythroxylum tortuosum</i>						
Morfo	1.121	1	0.266	0.862	1	0.391
Ano de coleta	2.106	1	0.039	3.034	1	0.003
Ano de coleta x Morfo	0.747	1	0.457	0.585	1	0.560

Tabela 3. Valores médios (\pm desvio padrão) de quatro variáveis relacionadas com a qualidade dos frutos e cinco relacionadas a qualidade das sementes de plantas brevistilas e longistilas de quatro espécies de *Erythroxylum* em uma área de Cerrado do Brasil Central. Após os valores médios e desvio padrão, são apresentados entre parênteses a quantidade de frutos ou sementes analisadas. Os valores de χ^2 (ou Z) e P dos modelos de cada variável para cada espécie também são mostrados. Em todos os casos, o grau de liberdade é igual a 1.

Espécie/Variável	Morfo Floral		Modelo	
	Brevistila	Longistila	χ^2	P
<i>Erythroxylum campestre</i>				
Comprimento do fruto (mm)	8.85 \pm 1.54 (21)	8.84 \pm 0.70 (38)	0.038	0.846
Comprimento da semente (mm)	7.49 \pm 1.40 (21)	7.81 \pm 0.72 (38)	1.318	0.251
Largura do fruto (mm)	6.58 \pm 0.77 (21)	6.81 \pm 0.66 (38)	0.746	0.388
Largura da semente (mm)	4.23 \pm 0.64 (21)	4.68 \pm 0.54 (38)	4.979	0.026
Biomassa do fruto (g)	0.23 \pm 0.07 (21)	0.26 \pm 0.06 (38)	3.021	0.082
Biomassa da semente (g)	0.10 \pm 0.03 (18)	0.11 \pm 0.02 (37)	1.804	0.179
Açúcar na polpa (%)	23.58 \pm 6.71 (12)	23.65 \pm 5.29 (17)	0.032	0.858
Sucesso de germinação (%)	0.53 \pm 0.51 (18)	0.70 \pm 0.41 (37)	1.248 ¹	0.212
Tempo de germinação (dias)	24.10 \pm 6.92 (10)	18.32 \pm 9.91 (28)	2.386¹	0.017
<i>Erythroxylum deciduum</i>				
Comprimento do fruto (mm)	9.70 \pm 0.85 (5)	8.44 \pm 0.97 (22)	1.993	0.158
Comprimento da semente (mm)	9.16 \pm 0.71 (5)	7.81 \pm 0.96 (22)	3.416	0.065
Largura do fruto (mm)	5.08 \pm 1.01 (5)	4.92 \pm 0.64 (22)	0.120	0.729
Largura da semente (mm)	3.94 \pm 0.65 (5)	3.75 \pm 0.59 (22)	0.001	0.987
Biomassa do fruto (g)	0.16 \pm 0.07 (5)	0.12 \pm 0.05 (22)	0.122	0.727
Biomassa da semente (g)	0.07 (2)	0.07 \pm 0.02 (9)	-	-
Açúcar na polpa (%)	13.00 (1)	17.50 \pm 5.32 (6)	-	-
Sucesso de germinação (%)	0.50 (2)	0.75 \pm 0.42 (9)	-	-
Tempo de germinação (dias)	7.00 (1)	9.71 \pm 3.95 (7)	-	-
<i>Erythroxylum suberosum</i>				
Comprimento do fruto (mm)	6.65 \pm 0.68 (53)	6.43 \pm 0.69 (51)	0.719	0.397
Comprimento da semente (mm)	5.79 \pm 0.60 (52)	5.55 \pm 0.61 (51)	1.363	0.243
Largura do fruto (mm)	5.18 \pm 0.72 (53)	4.91 \pm 0.64 (51)	0.449	0.503
Largura da semente (mm)	3.82 \pm 0.41 (52)	3.45 \pm 0.39 (51)	0.272	0.602
Biomassa do fruto (g)	0.10 \pm 0.03 (53)	0.08 \pm 0.03(51)	0.966	0.326
Biomassa da semente (g)	0.04 \pm 0.02 (33)	0.04 \pm 0.01 (23)	0.081	0.776
Açúcar na polpa (%)	19.96 \pm 6.93 (26)	20.25 \pm 5.11 (20)	0.008	0.928
Sucesso de germinação (%)	0.46 \pm 0.44 (33)	0.45 \pm 0.47 (22)	0.103 ¹	0.918
Tempo de germinação (dias)	16.82 \pm 11.73 (17)	14.18 \pm 5.38 (11)	0.630 ¹	0.529
<i>Erythroxylum tortuosum</i>				
Comprimento do fruto (mm)	6.62 \pm 0.55 (42)	6.93 \pm 0.74 (28)	0.764	0.382
Comprimento da semente (mm)	6.21 \pm 0.51 (42)	6.53 \pm 0.77 (28)	1.500	0.221
Largura do fruto (mm)	4.46 \pm 0.42 (42)	4.82 \pm 0.60 (28)	0.744	0.389
Largura da semente (mm)	3.51 \pm 0.30 (42)	3.72 \pm 0.50 (28)	0.545	0.462

Biomassa do fruto (g)	0.08 ± 0.02 (42)	0.10 ± 0.03 (28)	0.692	0.405
Biomassa da semente (g)	0.04 ± 0.01 (41)	0.04 ± 0.01 (23)	0.938	0.333
Açúcar na polpa (%)	16.21 ± 2.61 (14)	16.11 ± 3.79 (9)	0.008	0.928
Sucesso de germinação (%)	0.63 ± 0.42 (41)	0.84 ± 0.32 (22)	1.272 ¹	0.203
Tempo de germinação (dias)	13.54 ± 7.18 (24)	11.67 ± 6.26 (18)	0.919 ¹	0.358

¹ valores Z dos modelos.

Tabela 4. Resultados das análises dos modelos lineares generalizados mistos (distribuição poisson) averiguando alguns fatores que possam afetar a taxa de visitação (número de visitas/30 minutos; ver Material e Métodos para mais detalhes) em indivíduos de quatro espécies de *Erythroxylum* em uma área de Cerrado do Brasil Central. Os valores em negrito representam diferenças estatisticamente significativas.

Fonte de variação	<i>E. campestre</i>			<i>E. deciduum</i>			<i>E. suberosum</i>			<i>E. tortuosum</i>		
	Z	d.f.	P	Z	d.f.	P	Z	d.f.	P	Z	d.f.	P
Morfo	1.026	1	0.305	2.366	1	0.018	1.139	1	0.255	0.055	1	0.956
Número de flores	1.593	1	0.111	2.917	1	0.004	1.772	1	0.076	5.645	1	<0.001
Morfo x N° de flores	0.778	1	0.437	0.211	1	0.833	2.022	1	0.043	1.985	1	0.047

Tabela 5. Valores médios (± desvio padrão) da proporção de sementes predadas em plantas brevistilas e longistilas de quatro espécies de *Erythroxylum* em uma área de Cerrado do Brasil Central. Os valores estatísticos dos modelos lineares generalizados mistos (distribuição binomial) analisando diferenças entre morfos também são mostrados. Entre parênteses são indicados a quantidade de indivíduos amostrados.

Espécie	Morfo Floral		Z	d.f.	P
	Brevistila	Longistila			
<i>Erythroxylum campestre</i>	0.17 ± 0.35 (9)	0.05 ± 0.22 (20)	0.247	1	0.805
<i>Erythroxylum deciduum</i>	0.50 ± 0.58 (4)	0.39 ± 0.42 (9)	0.402	1	0.687
<i>Erythroxylum suberosum</i>	0.36 ± 0.30 (17)	0.52 ± 0.39 (14)	1.102	1	0.270
<i>Erythroxylum tortuosum</i>	0.01 ± 0.03 (12)	0.15 ± 0.32 (13)	1.838	1	0.066

Tabela S1. Espécies de visitantes florais e sua frequência relativa de visitas em flores de quatro espécies distílicas de *Erythroxylum* em uma área de Cerrado do Brasil Central.

Família/espécies de visitantes florais	Porcentagem de visitas nas espécies de plantas			
	<i>E. campestre</i>	<i>E. deciduum</i>	<i>E. suberosum</i>	<i>E. tortuosum</i>
Abelhas				
Apidae				
<i>Apis mellifera</i>	0.82	22.31	3.03	27.59
<i>Cephalotrigona capitata</i>	-	-	3.03	-
<i>Ceratina</i> sp.	-	-	3.03	-
<i>Ceratinula</i> sp.	12.30	1.65	-	-
<i>Exomalopsis fulvofasciata</i>	4.10	1.65	-	-
<i>Geotrigona subterranea</i>	-	3.31	-	-
<i>Paratrigona lineata</i>	-	5.79	18.18	31.03
<i>Scaptotrigona</i> sp.	-	4.13	-	-
<i>Tetragonisca angustula</i>	-	10.74	-	-
<i>Tetrapedia</i> sp.	-	-	4.55	-
<i>Trigona hyalinata</i>	-	-	-	3.45
<i>Trigona spinipes</i>	-	2.48	-	1.72
<i>Trigonisca</i> sp.	2.46	-	4.55	-
<i>Xanthopedia</i> sp.	-	2.48	6.06	-
<i>Xylocopa</i> cf. <i>subcyanea</i>	-	-	4.55	-
Halictidae				
<i>Augochlora</i> sp.	-	-	3.03	-
<i>Augochlorella ephyra</i>	-	2.48	-	-
<i>Augochloropsis</i> cf. <i>smithiana</i>	4.92	5.79	13.64	-
<i>Augochloropsis</i> sp. 1	3.28	-	1.52	3.45
<i>Augochloropsis</i> sp. 2	1.64	-	-	-
<i>Augochloropsis</i> sp. 3	-	0.83	-	-
<i>Rhinocorynura</i> sp.	-	0.83	1.52	-
Megachilidae				
<i>Austrostelis siluerai</i>	0.82	-	-	-
<i>Coelioxys</i> sp.	-	0.83	-	-
<i>Epanthidium</i> cf. <i>anisitsi</i>	4.10	-	-	-
<i>Megachile</i> (<i>Austrosarus</i>) <i>frankieana</i>	1.64	-	-	-
<i>Megachile</i> (<i>Leptaclina</i>) <i>lactea</i>	21.31	0.83	3.03	3.45
<i>Megachile</i> (<i>Pseudocentron</i>) sp.	1.64	-	-	-
<i>Megachile</i> sp.	4.10	-	-	-
sp.	2.46	-	-	-
Vespas				
Crabonidae				
<i>Bembix</i> sp.	0.82	0.83	-	-
sp.	-	0.83	-	-
Pompilidae				
<i>Pepsis</i> sp.	-	-	6.06	1.72
sp.	0.82	-	-	-
Sphecidae				
<i>Prionyx</i> sp.	3.28	-	-	-
sp. 1	-	-	1.52	-
sp. 2	4.10	-	-	-
sp. 3	-	-	3.03	6.90
sp. 4	5.74	-	-	-
sp. 5	-	2.48	-	-
sp. 6	-	-	-	1.72
Vespidae (Eumeninae)				
sp. 1	4.92	2.48	1.52	-
sp. 2	-	-	-	1.72
sp. 3	1.64	-	-	-
sp. 4	2.46	-	-	-
Vespidae (Polistinae)				

<i>Brachygastra</i> sp.	-	2.48	-	-
<i>Polibia</i> cf. <i>cericia</i>	-	1.65	3.03	-
<i>Polistes billardieri</i>	1.64	-	1.52	-
<i>Polistes satan</i>	-	0.83	-	-
<i>Polistes subsericius</i>	0.82	-	-	-
<i>Polistes</i> sp. 1	-	0.83	-	5.17
<i>Polistes</i> sp. 2	-	3.31	-	-
sp. 1	1.64	-	-	-
sp. 2	-	-	1.52	-
sp. 3	0.82	-	-	-
sp. 4	0.82	-	-	-
sp. 5	-	-	-	1.72
Borboletas				
sp. 1	-	0.83	-	-
sp. 2	1.64	-	-	-
sp. 3	-	0.83	1.52	-
sp. 4	-	0.83	-	-
Hesperiidae				
<i>Nyctelius nyctelius</i>	-	-	1.52	-
sp. 1	0.82	-	1.52	-
sp. 2	0.82	-	-	-
Lycaenidae				
<i>Strephonota</i> sp.	-	-	1.52	8.62
sp.	-	0.83	-	-
Pieridae				
sp.	-	1.65	-	-
Moscas				
sp. 1	-	9.09	3.03	-
sp. 2	-	1.65	-	-
sp. 3	-	-	-	1.72
Bombyliidae				
sp. 1	0.82	0.83	-	-
sp. 2	0.82	-	-	-
sp. 3	-	-	3.03	-
sp. 4	-	0.83	-	-
Syrphidae				
<i>Pseudodoros</i> sp.	-	0.83	-	-
Total de espécies visitantes	32	34	26	14

CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados encontrados nesta tese, é possível dizer que as espécies de *Erythroxylum* estudadas exibem variações no sistema floral distílico quanto aos componentes morfológicos (nível de hercogamia recíproca; razão entre morfos; características do pólen) e/ou fisiológicos (quebra do sistema de incompatibilidade). Os aspectos morfológicos do primeiro capítulo subsidiam e incentivam futuros estudos de evolução e funcionalidade da heterostilia em *Erythroxylum*, além também de possibilitar conclusões relevantes para um grupo de plantas pouco estudado, porém abundante no Cerrado. Pela primeira vez, foram fornecidas informações a respeito das variações na razão dos morfos em diferentes populações. Estudos anteriores com espécies heterostílicas de *Erythroxylum* não encontraram tais variações. Dentre as espécies estudadas, *E. campestre* merece uma maior atenção por apresentar populações monomórficas, anisopléticas e isopléticas. Também foram encontradas variações substanciais na posição das anteras e estigmas, bem como no nível de hercogamia recíproca entre espécies e populações. Estes resultados são importantes para entender a funcionalidade do sistema distílico e as implicações da variação morfológica para a promoção da transferência de pólen intermorfo.

Embora as quatro espécies estudadas sejam morfológicamente distílicas, todas elas possuem algum grau de esterilidade masculina e os resultados do segundo capítulo sugerem que *E. campestre* e *E. deciduum* possam estar em um processo de especialização sexual. Estas duas espécies apresentam esterilidade masculina morfo-tendenciosa, com flores brevistilas produzindo menor proporção de grãos de pólen viáveis, sendo este resultado consistente com trabalhos relacionados. O motivo da esterilidade masculina morfo-tendenciosa ocorrer apenas em determinadas espécies ainda não está claro. Acredita-se que as características genéticas intrínsecas de cada táxon têm uma certa influência, de modo que cada espécie responde de maneira diferente perante as mesmas pressões seletivas que estão submetidas. Uma vez que existe uma dependência reprodutiva entre os morfos florais, espera-se que a esterilidade masculina associada as plantas brevistilas de *E. campestre* e *E. deciduum* pudessem afetar a função feminina das longistilas, resultando no estabelecimento de uma dioícia funcional. Contudo, não foram encontradas relações entre a esterilidade masculina de um morfo e o sucesso reprodutivo do morfo oposto.

O fato das flores brevistilas apresentarem esterilidade masculina apenas parcial e produzirem muitos grãos de pólen, provavelmente, está ligado a esterilidade não ter chegado a um limiar que afete a função feminina do morfo oposto. Assim, *E. campestre* e *E. deciduum*

podem estar em um estágio intermediário para a dioiccia via ginodioiccia. Se considerarmos que há um contínuo de estágios evolutivos entre o hermafroditismo e a dioiccia, estas duas espécies podem representar um passo inicial no contínuo. No entanto, os modelos evolutivos da ginodioiccia sugerem que para as plantas com esterilidade masculina (brevistilas) persistirem, elas devem apresentar alguma vantagem reprodutiva sobre as hermafroditas (longistilas). Os resultados do terceiro capítulo indicam que as plantas brevistilas de *E. campestre* e *E. campestre* não exibem nenhuma vantagem reprodutiva por meio da realocação de recursos sobre as longistilas. Isto pode representar uma restrição à evolução da esterilidade masculina nas plantas brevistilas e, conseqüentemente, à evolução da ginodioiccia. Diferentemente das duas espécies com indício de especialização sexual, em *E. suberosum* e *E. tortuosum*, a distilia parece ser um sistema floral, evolutivamente, estável. Isto porque a esterilidade masculina ocorre em baixa frequência em ambos os morfos (não existindo esterilidade morfo-tendenciosa) e não foram encontradas variações entre plantas brevistilas e longistilas quanto aos traços reprodutivos analisados.

Os resultados apresentados na presente tese fornecem informações relevantes a respeito do sistema distílico e da especialização sexual em quatro espécies de *Erythroxylum* no Cerrado. Entretanto, vários estudos adicionais devem ser desenvolvidos para uma compreensão mais detalhada das situações aqui encontradas, como: (1) filogenia molecular robusta para verificar se as variações encontradas entre as populações e espécies se enquadram nas transições propostas pelos modelos evolutivos da heterostilia; (2) estudos com uma perspectiva funcional e comparativa para compreender o motivo das variações na reciprocidade e se elas afetam na transferência de pólen intermorfo em espécies de *Erythroxylum*; (3) aumentar o número de populações amostradas para entender os mecanismos que governam a razão dos morfos florais dentro das populações, assim como a fertilidade dos morfos; (4) estudos que exploram os mecanismos que geram a esterilidade masculina em espécies de *Erythroxylum* para determinar quais fatores estão envolvidas nos complexos padrões observados entre espécies e populações; (5) explicar como um genótipo de esterilidade masculina pode invadir e persistir nas plantas brevistilas de *E. campestre* e *E. deciduum* sem haver um efeito compensatório; e (6) estudos que verificam se a compensação feminina nas plantas brevistilas de *E. campestre* e *E. deciduum* ocorre em estágios posteriores após a germinação.