

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

KARINE FONSECA DOS SANTOS

**ONTOGENIA E FUNÇÃO DO ROSTRO EM *Rhynchanthera grandiflora*
(Aubl.) DC. (MELASTOMATACEAE)**

UBERLÂNDIA
2019

KARINE FONSECA DOS SANTOS

**ONTOGENIA E FUNÇÃO DO ROSTRO EM *Rhynchanthera grandiflora*
(Aubl.) DC. (MELASTOMATACEAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à coordenação do curso de
Ciências Biológicas, da Universidade
Federal de Uberlândia, como requisito
para a obtenção do grau de Bacharelado
no curso de Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Vinícius Lourenço Garcia de Brito (UFU)
Coorientadora: Prof. Dra. Ana Paula de Souza Caetano (UFMT)

UBERLÂNDIA

2019

KARINE FONSECA DOS SANTOS

**ONTOGENIA E FUNÇÃO DO ROSTRO EM *Rhynchanthera grandiflora* (Aubl.) DC.
(MELASTOMATACEAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado para obtenção do grau de Bacharelado, no curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, pela banca examinadora formada por:

Prof. Dr. Vinícius Lourenço Garcia de Brito (UFU)

Prof. Dr. Diana Salles Sampaio (UFU)

Me. João Custódio Fernandes Cardoso

Uberlândia, 28 de junho de 2019.

Agradecimentos

Ao Pai Celestial, por tornar tudo possível e pelo amor incondicional.

Aos meus pais, Lucinei e Edson, por acreditarem e confiarem em mim, pelo incentivo e apoio, por cada ensinamento e por me ensinarem o valor do trabalho.

Ao Daniel, meu namorado e amigo, pelo companheirismo, apoio e aprendizado conjunto.

À minhas irmãs, Karen e Karoline, pelo carinho, apoio e amizade. E à minha querida sobrinha Luiza por cada meigo sorriso.

Aos meus orientadores, Ana Paula e Vinicius. À Ana, por sua determinação, por me adotar na pesquisa e acreditar no meu potencial. E ao Vini, por estimular um ambiente de aprendizado construtivo e coletivo.

Ao Túlio, Larissa, Uiara, Marcinha, Mariana, Renata, Lilian, Vanessa e a toda a galerinha do NERP, por me ajudarem em vários aspectos do desenvolvimento deste trabalho.

À Diana e ao João, por aceitarem participar da banca, por lerem o trabalho e por cada valiosa sugestão.

À cada colega, funcionário e professor que conheci durante a graduação, por me possibilitarem um crescimento em diversos aspectos. Especialmente a Evelise e a Tainara, por cada experiência que passaram comigo durante a graduação.

À Universidade Federal de Uberlândia pela estrutura dos laboratórios e por cada material e profissional disponibilizado para meus estudos e aprendizado.

Àqueles que não foram aqui mencionados, mas que contribuíram direta ou indiretamente para esse trabalho e para meu desenvolvimento durante a graduação.

À todos, o meu muito obrigada!!

ONTOGENIA E FUNÇÃO DO ROSTRO EM *Rhynchanthera grandiflora* (Aubl.) DC. (MELASTOMATACEAE)¹

Karine F. dos Santos²; Vinícius L. G. de Brito²; Ana Paula de S. Caetano³.

²Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil

³Departamento de Botânica e Ecologia, Instituto de Biociências, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, MT, Brasil

Premissa da Pesquisa. Estruturas florais inovadoras podem estar relacionadas a alteração de funções de um determinado órgão. O rostro, por afunilar a região de saída do pólen em anteras poricidas, deve restringir a liberação do pólen a cada visita, permitindo sua liberação diferencial entre as anteras de alimentação e de polinização, e para tanto deve ter tamanho relativamente diferente entre elas. Foi avaliada a ontogenia e influência do rostro na liberação de pólen entre os tipos de anteras.

Metodologia. A partir de coletas de botões e flores da espécie *Rhynchanthera grandiflora*, foram analisados a estrutura, desenvolvimento e velocidade de crescimento das anteras. Também foi realizado um experimento comparando a quantidade de pólen, entre a antera de polinização e as de alimentação, nos tratamentos: botão, flor com rostro após a simulação de uma visita e flor com rostro excisado após a simulação de uma visita.

Resultados principais. O rostro é estruturalmente similar entre os tipos de anteras. Nele há uma zona de deiscência que se desintegra formando um canal. E na região poro do rostro a cutícula é ausente. O rostro é relativamente maior nas anteras de alimentação e a proporção de grãos de pólen remanescentes não diferiu entre os tipos de anteras. A estrutura parece não restringir a quantidade de pólen liberado na simulação de uma única visita.

Conclusões. A anatomia e ontogenia do rostro foram descritas pela primeira vez. No rostro sugere-se a ocorrência de morte celular programada na desintegração da zona de deiscência. E a ausência de cutícula na região do poro deve possibilitar que o poro se abra na antese. O rostro aparentemente não proporciona uma economia de pólen na simulação de uma visita, então sugere-se como nova hipótese que o rostro deve promover uma deposição mais precisa do pólen dos dois tipos de anteras no corpo do polinizador, de forma a ressaltar a divisão de trabalho.

Palavras-chave: anteras rostradas, deiscência poricida, heteranteria, flores de pólen, divisão de trabalho, vibração.

¹ Trabalho de Conclusão de Curso formatado nos moldes da revista International Journal of Plant Sciences.

A cópia das normas exigidas pela revista está no Anexo 1.

Introdução

A impressionante abundância de espécies de angiospermas é acompanhada por uma enorme diversidade floral (Reference). As flores têm um papel fundamental na biologia reprodutiva do grupo, sendo reconhecida como uma inovação chave que potencializou sua diversificação (Friis et al. 2006). A partir de uma organização floral básica, composta por órgãos que formam um padrão ordenado, estruturas florais inovadoras podem adicionar funções a um determinado elemento, ou ainda, provocar uma alteração completa da sua função original (Walker-Larsen e Harder 2000; Fan e Li 2016). Estruturas florais inovadoras são, em termos taxonômicos, amplamente distribuídas entre as angiospermas (Walker-Larsen e Harder 2000) e há indícios de que elas têm importância essencial na polinização e devem estar relacionadas à interação das plantas com seus polinizadores (Anderson et al. 2005; Han et al. 2008; Fan e Li 2016).

Entre as modificações florais, mudanças no androceu são especialmente comuns, e podem levar à perda de estames funcionais ou à papéis adicionais àqueles de produção e apresentação do pólen (Han et al. 2008; Dellinger et al. 2014; Fan e Li 2016). Anteras com deiscência poricida e heteranteria - ocorrência de estames morfológicamente diferentes em uma mesma flor - são modificações estaminais frequentes nas “flores de pólen”, que são aquelas que oferecem o pólen como único recurso floral (Vogel 1978; Vallejo-Marín et al. 2009). Nestas flores, o grão é utilizado pelos polinizadores, principalmente abelhas, como alimento para as larvas nas células de cria e ao mesmo tempo transporta os gametas masculinos, que participam do evento de dupla fecundação (Westerkamp 1996; Schlindwein et al. 2005; Luo et al. 2008; Vallejo-Marín et al. 2009; Barrett 2010). Essa divergência entre a função reprodutiva e de recompensa do pólen gera um dilema para as flores (i.e. dilema de pólen), já que elas não podem perder todos os grãos para o polinizador, pois dependem deles para a fecundação (Westerkamp 1997).

Neste sentido, a deiscência poricida tem um importante papel pois limita a coleta de pólen à um pequeno grupo de polinizadores, que precisam vibrar as anteras para que os grãos sejam liberados, restringindo a coleta do pólen enquanto mantêm sua transferência pelo polinizador, principalmente abelhas (Harder e Barclay 1994; Hargreaves et al. 2009; De Luca e Vallejo-Marín 2013; Vallejo-Marín 2019). Tal estratégia está comumente associada à heteranteria, que se trata da presença de tipos de anteras que diferem na forma, cor, e/ou tamanho dos estames na mesma flor (Vallejo-Marín et al. 2009, 2010; Barrett 2010). Em

geral, anteras menores e acessíveis aos polinizadores produzem o pólen utilizado principalmente como recurso alimentar (i.e. anteras de alimentação), enquanto anteras maiores e comumente deslocadas do principal eixo floral liberam grãos essencialmente para a função reprodutiva (i.e. anteras de polinização) (Muller 1883; Barrett 2010). Essa divisão de trabalho nas funções de alimentação e polinização possivelmente também diminui o dilema de pólen na flor, evitando que todos os grãos de pólen sejam utilizados como recurso pelos polinizadores (Luo et al. 2009; Vallejo-Marín et al. 2009, 2010).

Melastomataceae é uma das mais de 20 famílias de angiospermas onde anteras poricidas podem estar associadas à heteranteria (Vallejo-Marín et al. 2010). Esse dimorfismo estaminal é particularmente comum em determinadas tribos da família, entre elas Microlicieae, onde a divisão de trabalho tem sido estudada (e.g. Velloso et al. 2018). No grupo, as espécies são caracterizadas, entre outros atributos, pela ocorrência de anteras com ápice rostrado, que se trata do estreitado em forma de um tubo (Romero 2003; Fritsch et al. 2004; Michelangeli et al. 2013). Apesar de o rostro afunilar a região de saída do pólen, o desenvolvimento e função dessa incomum estrutura estaminal ainda permanecem desconhecidos.

O rostro, sendo um prolongamento estreito do ápice da antera, deve aumentar a resistência à liberação dos grãos a cada visita, permitindo uma liberação diferencial de pólen entre os dois tipos de anteras, como previsto pela hipótese de divisão de trabalho. E para que essa função seja desempenhada, espera-se que o rostro entre os dois tipos de anteras, tenham tamanhos relativos diferentes. Neste contexto, o presente trabalho teve como principais objetivos avaliar pela primeira vez na literatura a ontogenia do rostro, sua função e influência na liberação de pólen entre os diferentes tipos de anteras em *Rhynchanthera grandiflora* (Microlicieae, Melastomataceae), uma espécie com estames dimórficos e anteras rostradas (Bacci et al. 2016).

Esperamos que o papel do rostro esteja relacionado à diminuição da quantidade de pólen liberada a cada visita na flor. Ainda, acreditamos que o desenvolvimento do rostro na antera de polinização (estame maior) seja mais lento em relação ao das anteras de alimentação (estames menores), levando a formação de um rostro relativamente menor na primeira. Também esperamos que esse rostro relativamente menor permite que uma maior quantidade de pólen seja liberada na antera de polinização quando comparado a quantidade de grãos liberados naquelas de alimentação, uma vez que essas últimas presumivelmente apresentam menos pólen.

Materiais e Métodos

Espécie modelo e área de estudo

Rhynchanthera grandiflora (Aubl.) DC é um bom modelo para se estudar a ontogenia, estrutura e a função do rostro, uma vez que apresenta flores grandes e facilmente manipuláveis, androceu com estames dimórficos, sendo quatro menores (de alimentação) e um maior (de polinização), e ápice das anteras com rostro de três a cinco milímetros de comprimento (fig. 1) (Bacci et al. 2016). A espécie floresce e frutifica na maior parte do ano, ocorrendo em locais úmidos, mas não necessariamente associados a veredas (Bacci et al. 2016). O material testemunha está depositado no herbário HUFU sobre o número HUFU 66695.



Figura 1 Morfologia floral de *Rhynchanthera grandiflora*. A, vista frontal da flor. B, vista lateral da flor, evidenciando os estames dimórficos, sendo quatro menores (de alimentação) e um maior (de polinização).

As coletas e os experimentos no campo foram realizados no período de fevereiro a maio de 2018, na Reserva particular de patrimônio natural do Clube Caça e Pesca Itororó de Uberlândia (CCPIU), uma área do município de Uberlândia, Minas-Gerais. A Reserva apresenta 127 hectares e é composta por vegetação de Cerrado (Alvarenga et al. 2007). A região apresenta duas estações bem marcadas, uma chuvosa e a outra seca (Rosa e Schiavini 2006), e clima do tipo subtropical (Cwa) segundo a classificação de Köppen (Alvares et al. 2013).

Estrutura, desenvolvimento e velocidade de crescimento das anteras

Flores abertas e botões florais de diferentes tamanhos foram coletados, fixados em solução de FAA 50% (formaldeído, ácido acético glacial, 50% de etanol; 5: 5: 90 v/v) e posteriormente armazenados em álcool 70% v/v (Johansen 1940). Os botões foram separados em faixas de tamanhos (milímetros) e as anteras de ambos os tipos de estames, oriundas das flores e botões de diferentes tamanhos foram selecionadas. Uma parte do material foi submetida a análise ontogenética por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e anatomia, e outra parte foi utilizada para comparação da velocidade de crescimento entre anteras de polinização e de alimentação, por meio da medida do comprimento do rostro e das tecas.

Para o exame de MEV as anteras foram desidratadas em série etanólica, submetidas ao ponto crítico em aparelho Leica® CPD 300, montadas e fixadas em suportes metálicos com fita adesiva de carbono dupla face e cobertas com ouro paládio por 100 segundos em um metalizador Leica® EM SCD050. A análise e digitalização foram realizadas em um Microscópio Eletrônico de Varredura Zeiss® (EVO/MA10) no Laboratório Multiusuário de Microscopia da Faculdade de Engenharia Química (LAMEV) da UFU.

Para anatomia, as anteras foram desidratadas em série etílica crescente até etanol absoluto e posteriormente incluídas em glicolmetacrilato Leica® conforme as recomendações indicadas pelo fabricante. Secções longitudinais e transversais de 3-5µm foram obtidas em micrótomo rotativo Leica® RM 2135, aderidas às lâminas de vidro e coradas em solução de azul de toluidina a 0,05% em tampão acetato de sódio, pH4,7 (O'Brien et al. 1964). As lâminas foram montadas temporariamente em água. Algumas lâminas foram coradas com Sudan IV, para verificar presença de cutícula (Johansen 1940). As observações e captura das imagens foram realizadas em microscópio de luz Olympus® BX51 com câmera digital acoplada Olympus® DP70, no Laboratório de Morfologia, Microscopia e Imagem (LAMOVI) da UFU.

Para comparação do tamanho do rostro e das tecas, as anteras de polinização e de alimentação, retiradas dos botões de diferentes tamanhos, foram colocadas na posição ventral em uma placa de petri e sobrepostas por outra placa de petri menor para mantê-las imobilizadas. A captura das imagens foi realizada em lupa Leica® SAPO com câmera digital acoplada Leica® MC 170 HD. A partir das imagens capturadas na lupa, os comprimentos dos rostros e das tecas foram obtidos no programa ImageJ®.

Experimento deliberação de pólen

Usando sacos de organza, botões florais de 31 indivíduos foram ensacados. Em cada planta, foram utilizados um botão floral e duas flores não visitadas. Nessas últimas, uma flor foi deixada intacta (com rostro) e outra teve o rostro excisado. Isso foi feito com o auxílio de uma tesoura de ponta fina, com o corte feito um pouco acima da base do rostro na antera de polinização e em uma das anteras de alimentação. Os estames de ambos os tratamentos foram vibrados uma vez por meio de uma escova elétrica Philips® Sonicare durante dois segundos, numa frequência aproximada de 248 Hz, simulando a visita de uma abelha. Essa frequência representa bem a faixa de ‘buzz’ de 200-320Hz (Burkart et al. 2011), relativa a importantes polinizadores de *Rhynchanthera grandiflora* (Renner 1989, 1990). Um ‘buzz’ foi definido por Vallejo-Marín (2019) como “uma vibração ininterrupta, independentemente de sua duração”.

Para cada um dos 93 botões e flores, foram coletadas a antera de polinização e uma antera de alimentação para contagem dos grãos de pólen, totalizando 186 anteras. As anteras foram individualmente armazenadas em eppendorfs contendo álcool 70%. Posteriormente, cada eppendorf foi agitado com bolinhas de metal em um TissueLyser Retsch® MM 400, para macerar as anteras. O álcool remanescente foi evaporado em estufa e 500µl de carmim acético foram adicionados. A solução foi então homogeneizada durante 1 minuto em vórtex e uma alíquota de 20µl foi utilizada para contagem dos grãos de pólen em câmara de Neubauer (Radford et al. 1974). O número total de grãos de pólen que permaneceu nas anteras foi então estimado.

Análises estatísticas

Para descrever o desenvolvimento dos rostros e tecas das anteras de polinização e de alimentação, foram ajustados modelos lineares considerando que o comprimento do rostro é uma função linear simples ou quadrática do comprimento das tecas. Depois de verificar qual fator é significativo, os parâmetros foram usados para construir um gráfico de desenvolvimento do rostro em relação ao desenvolvimento das tecas. Para saber se a taxa de crescimento do rostro relativa à teca é maior nas anteras de alimentação do que na antera de polinização, foi ajustado um modelo onde a variável resposta foi o comprimento do rostro e as variáveis explicativas foram o comprimento das tecas, o quadrado do comprimento das tecas e o tipo de antera. Nesse modelo a identidade da flor foi considerada variável aleatória.

Posteriormente esse modelo foi comparado a um modelo onde estavam incluídas apenas a variável resposta e a variável aleatória (modelo nulo). Os dois modelos foram comparados em uma tabela de ANOVA por um teste de Qui-quadrado.

Para entender se existe diferença na quantidade de pólen entre os tipos de anteras e os tratamentos, com rosto e sem rosto, foi construído um modelo linear misto considerando a quantidade de pólen remanescente na antera após a vibração como variável resposta e o tipo de antera bem como o tratamento realizado como variáveis preditoras. Os indivíduos foram considerados uma variável aleatória. Após ajustar o modelo, foi analisada a significância de cada fator fixo na variável resposta usando uma tabela de Análise de Variância tipo III (ANOVA) através do método de Satterthwaite. Para comparar se existe diferença na quantidade de pólen remanescente nas anteras nos diferentes tratamentos foi realizado um teste t par-a-par com correção de Bonferroni.

Resultados

Estrutura e desenvolvimento do rosto da antera

O rosto dos dois tipos de estames é estruturalmente muito similar (fig. 2A-B e 3A-D). Ele aparece como uma pequena protuberância na porção distal da antera de estames em estádios intermediários de desenvolvimento, quando as tecas já estão diferenciadas (fig. 2A-B). O crescimento dessa estrutura culmina na formação de uma longa extensão delgada tubular, que em estames de flores em antese, chega a ter aproximadamente 2/5 do comprimento da antera (fig. 2A-B).

As observações histológicas revelaram que o rosto se desenvolve como uma estrutura maciça, que inicialmente cresce principalmente a partir de divisões celulares de uma região meristemática localizada em sua porção mais distal, e em um segundo momento, cresce sobretudo por expansão celular (fig. 3A-D). O rosto é constituído por uma epiderme que recobre um tecido estéril, formado por células parenquimáticas entremeadas por um feixe vascular que se estende até mais da metade da estrutura (fig. 3B-C, E).

É possível reconhecer, desde o início do alongamento do rosto, a delimitação de uma zona de deiscência que fica mais destacada a medida que o rosto se desenvolve (fig. 4A-C). Essa zona é contínua desde a base da estrutura, em contato com o lóculo da antera, onde os grãos de pólen se desenvolvem, até a região mais distal, onde se diferencia o poro (fig. 4D-E). Tal zona é formada por algumas camadas de células achatadas e menores que as células

parenquimáticas circundantes (fig. 4F). Os cortes transversais evidenciam que esta linha de deiscência se localiza voltada para a região ventral do rostro, e se estende de um lado a outro da estrutura (fig. 4A-C).

Ao final do desenvolvimento estaminal, próximo a antese da flor, as células da zona de deiscência se desintegram, levando a formação de um canal contínuo desde a região das tecas até o poro da antera, por onde os grãos de pólen percorrerão para serem liberados (fig. 5A-D). Em flores abertas, o lúmen deste canal ocupa uma grande extensão da região interna do rostro (fig. 5C-D). O poro (fig. 6A-C) se diferencia na porção mais distal do rostro ao longo do desenvolvimento do estame, transformando-se de uma região de células meristemáticas pouco diferenciada (fig. 3A) para uma região com células epidérmicas onde a cutícula é ausente, seguidas por algumas camadas de células parenquimáticas, onde a zona de deiscência termina (fig. 4E e 6D-F).

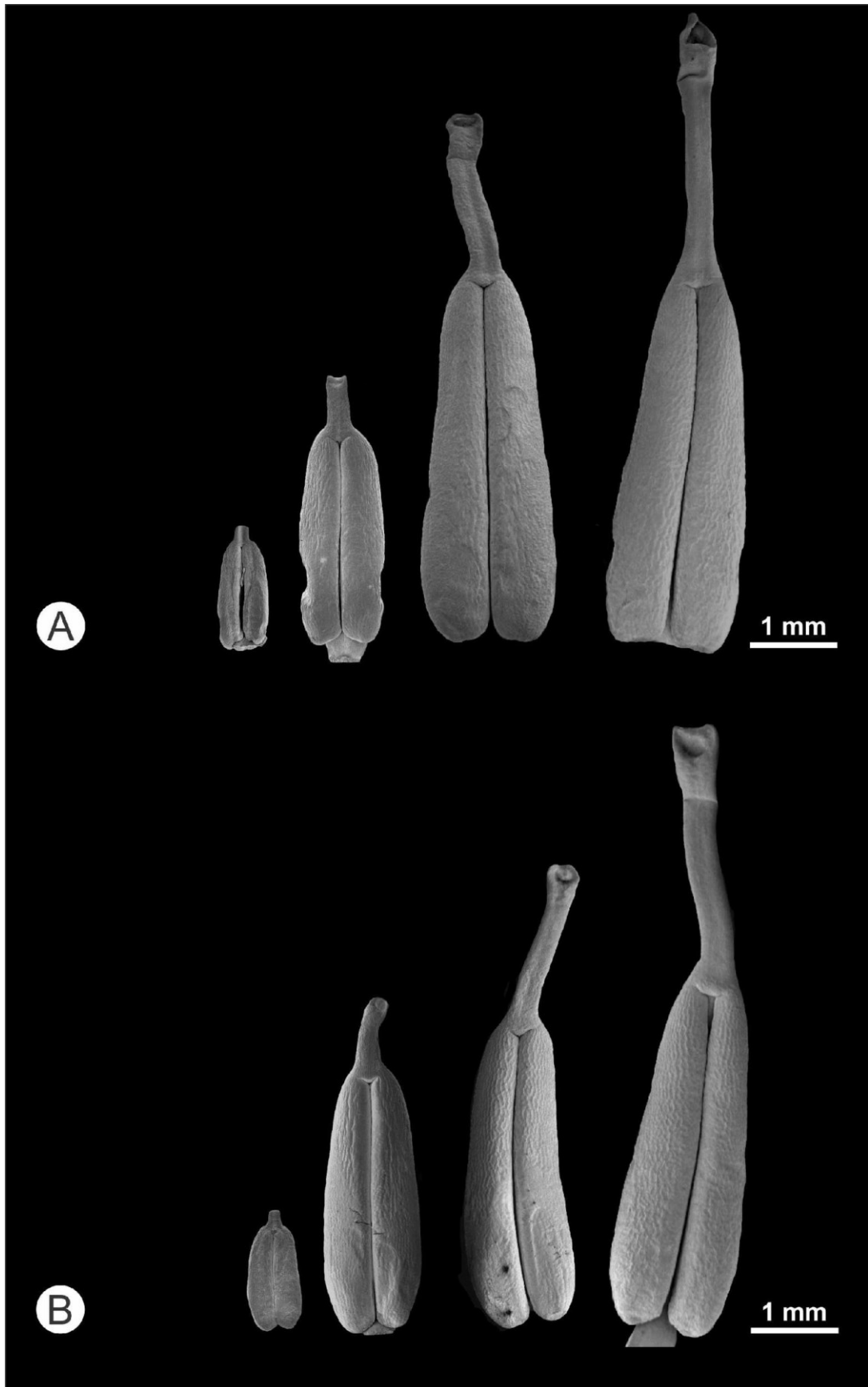


Figura 2 Anteras de polinização (A) e alimentação (B) de *Rhynchanthera grandiflora* em diferentes fases de desenvolvimento, desde o início do desenvolvimento do rostro até um pouco antes da antese, sob microscopia eletrônica de varredura.

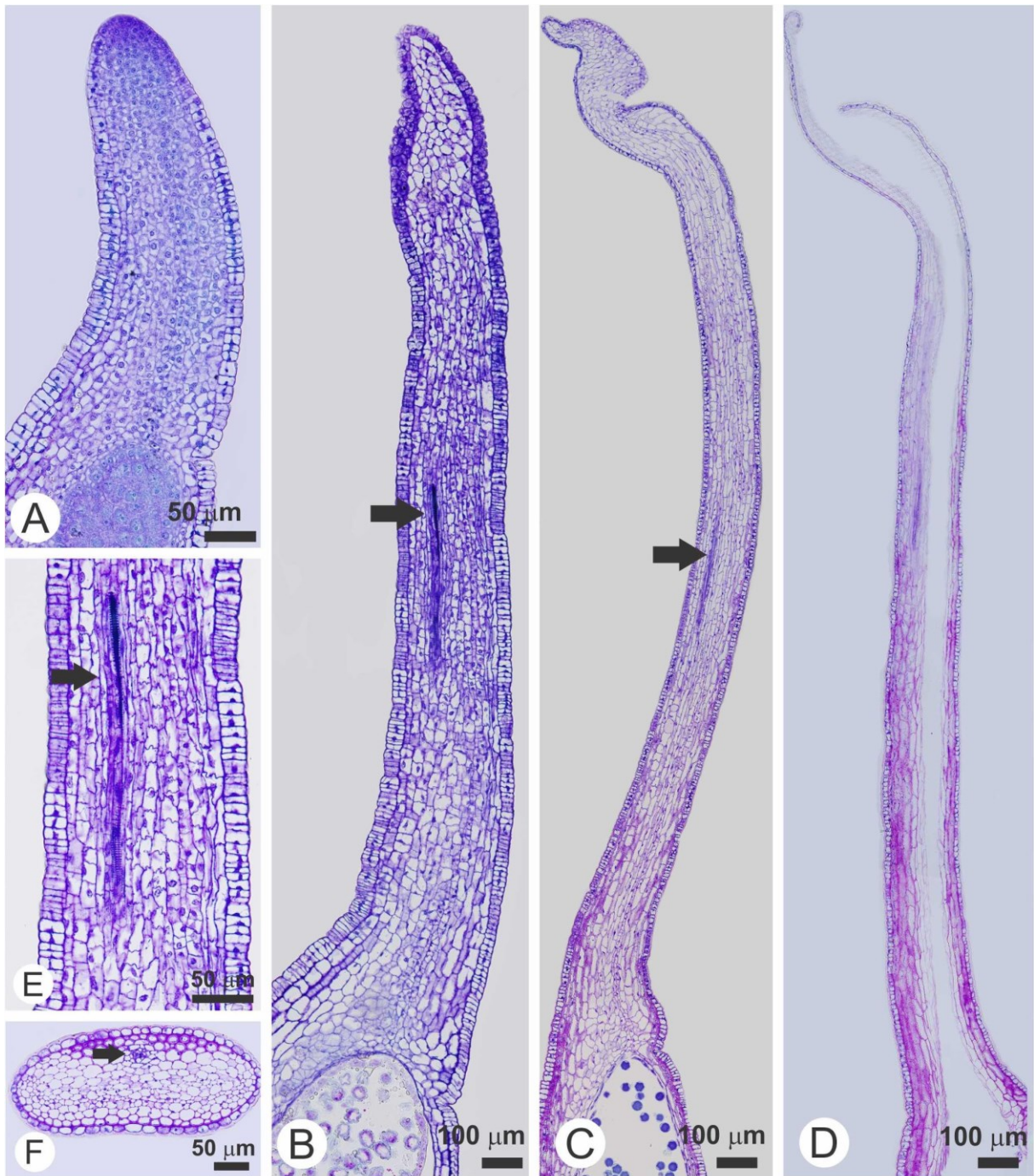


Figura 3 Anatomia do rostro em *Rhynchanthera grandiflora*. A, rostro da antera de polinização, no início de seu desenvolvimento, em secção longitudinal; na sua porção mais distal localiza-se uma região meristemática. B-C, rostros de anteras de alimentação nos estágios intermediários de desenvolvimento, em secções longitudinais; as setas indicam o feixe vascular se estendendo até mais da metade do rostro. D, rostro da antera de polinização de uma flor, secção longitudinal. E, detalhe do feixe vascular de B. F, rostro da antera de polinização em secção transversal. As setas indicam feixes vasculares.

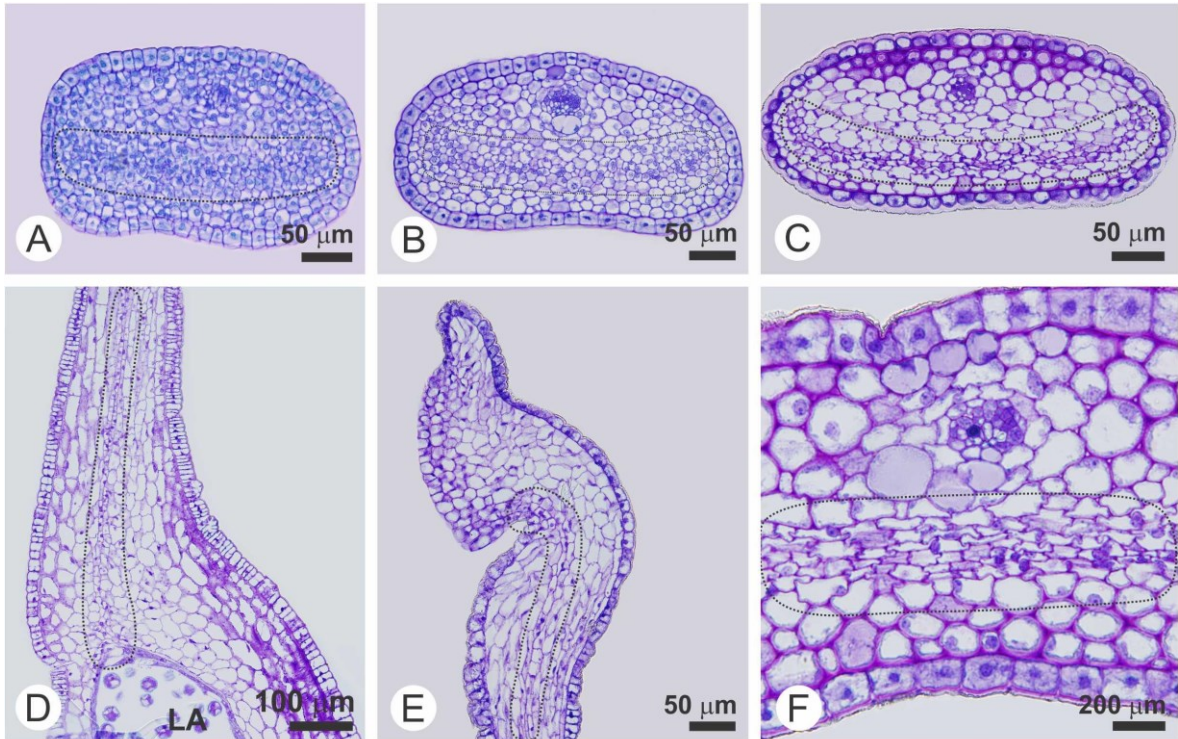


Figura 4 Detalhe da zona de deiscência do rostró em *Rhynchanthera grandiflora*. A-B, rostros de anteras de polinização, em desenvolvimento inicial e intermediário, respectivamente, secções transversais. C, rostró de antera de alimentação, próximo a antese, secções transversais. D, rostró de antera de polinização, em estágio intermediário de desenvolvimento, secção longitudinal. E-F, rostros de anteras de alimentação, em estágio próximo a antese, secção longitudinal e transversal, respectivamente. LA- Lóculo da antera.

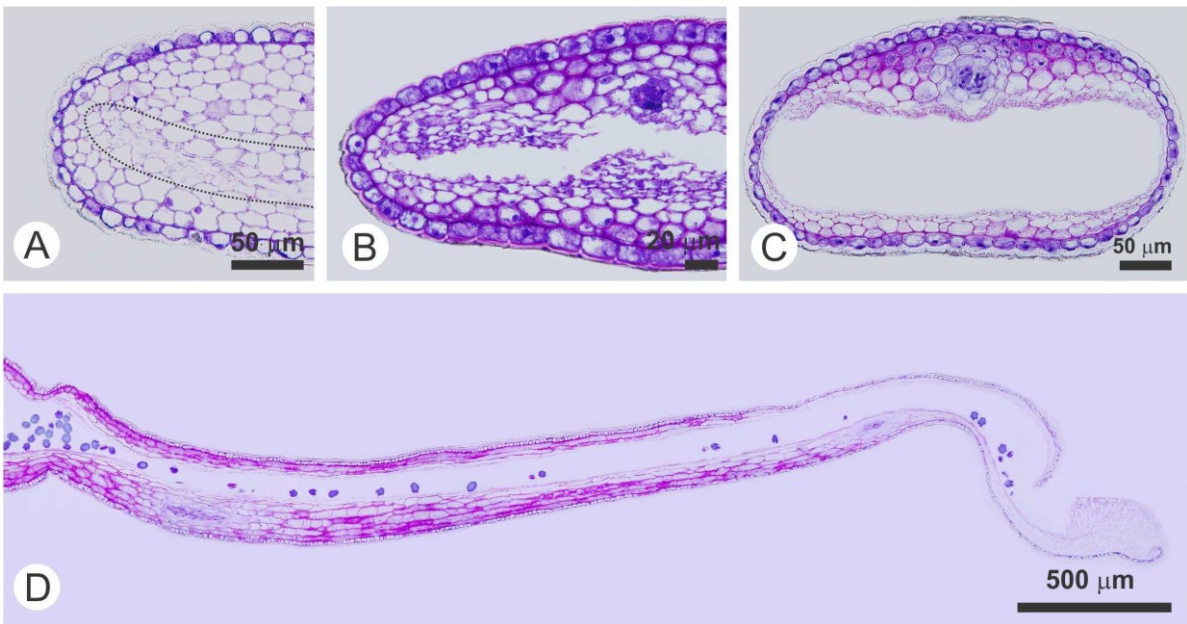


Figura 5 Desintegração celular para a formação do canal do rostró de anteras de polinização, em *Rhynchanthera grandiflora*. A-B, em destaque observa-se no rostró células se desintegrando a partir da zona de deiscência, em estágios próximos a antese, secções transversais. C, lúmen do rostró da antera de uma flor, secção transversal. D, canal do rostró por onde os grãos de pólen percorrem para serem liberados, secção longitudinal.

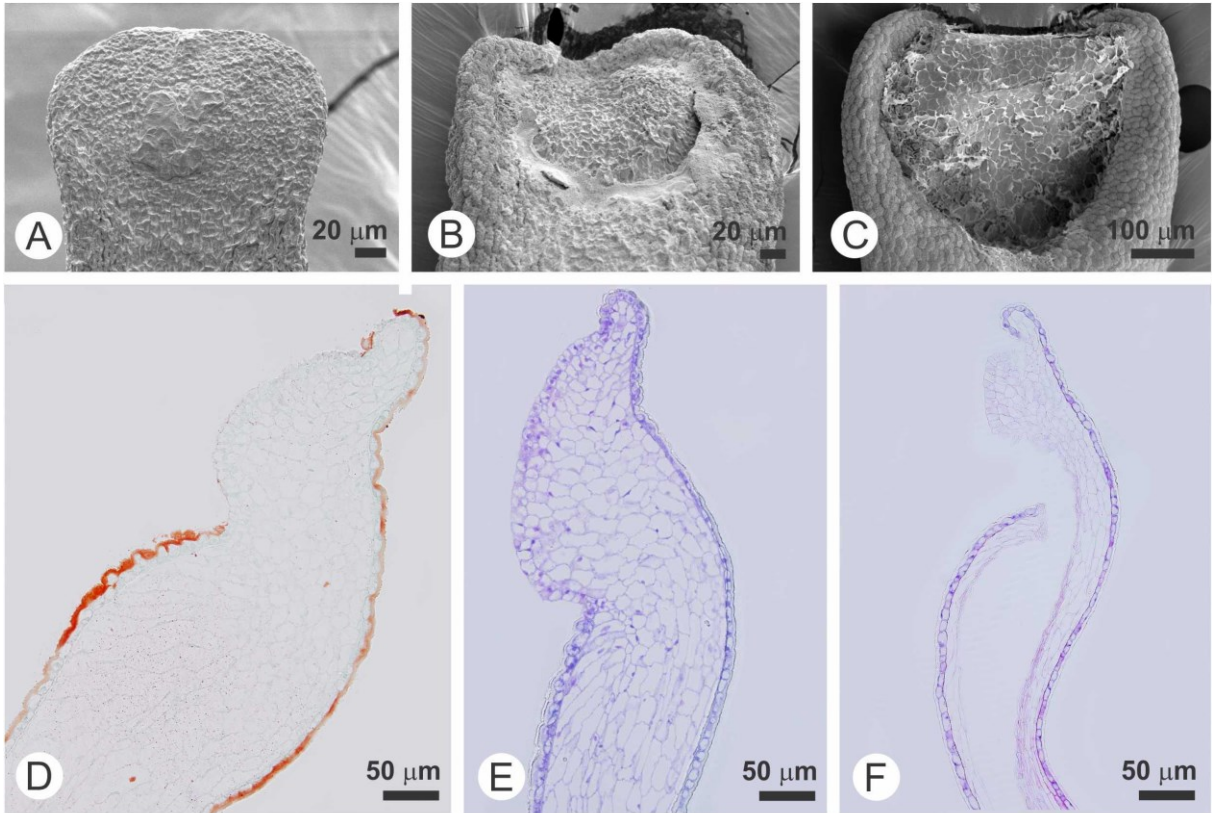


Figura 6 Região do poro do rostro, em *Rhynchanthera grandiflora*. A-C, poro do rostro de anteras de alimentação em desenvolvimento inicial, intermediário e próximo a antese, respectivamente, sob microscopia eletrônica de varredura. D, detalhe da ausência de cutícula no poro do rostro de antera de polinização, secção longitudinal corada com Sudan IV. E-F, poro do rostro de anteras de polinização, em estágio próximo a antese e na antese, respectivamente, secções longitudinais.

Crescimento das anteras

Existe uma relação quadrática entre o crescimento das tecas e o crescimento do rostro em ambos os tipos de anteras (anteras de polinização: $y = 0.19503 - 0.05096x + 0.11913x^2$; R^2 ajustado = 0.8811; $F = 375.4$; $p < 0.05$; anteras de alimentação: $y = 0.01937 + 0.15299x + 0.10501x^2$; R^2 ajustado = 0.8684; $F = 334.1$; $p < 0.05$). Assim, a partir do seu surgimento, o rostro cresce mais rapidamente que o restante da antera (fig. 7). O crescimento do rostro é diferente entre as duas anteras, sendo que ele cresce mais na antera de alimentação do que na de polinização (fig. 7; $\chi^2 = 83.083$; $p < 0.05$). Desta forma, no final do desenvolvimento, o tamanho do rostro é proporcionalmente maior nas anteras de alimentação do que nas anteras de polinização.

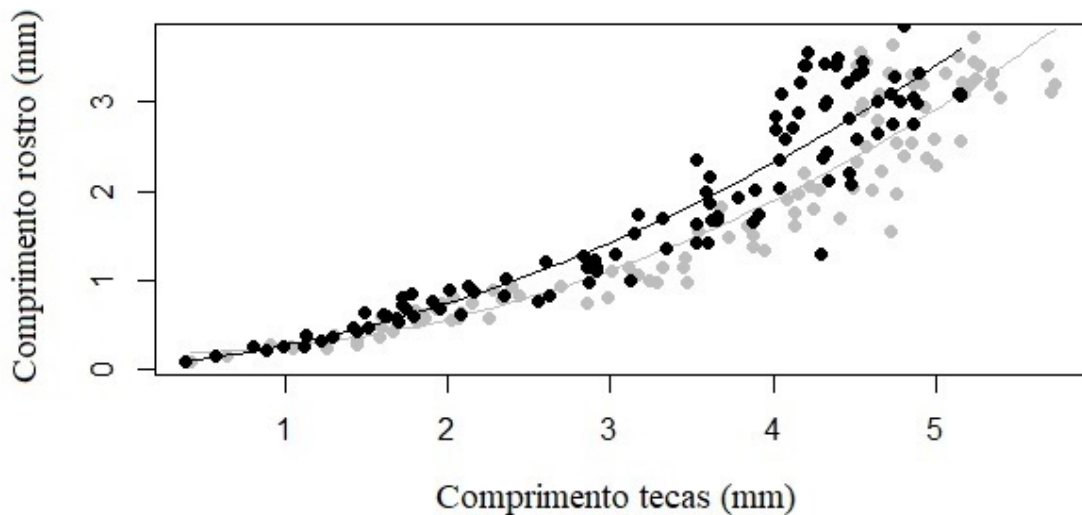


Figura 7 Relação entre o tamanho do rostro e das tecas ao longo do desenvolvimento floral. A linha e símbolos em cinza representam as anteras de polinização e em preto as anteras de alimentação.

Função do rostro da antera

Existe diferença na quantidade de grãos de pólen produzidos nos dois tipos de anteras ($F = 33.2800$; $df = 1$; $p < 0.05$). As anteras maiores, de polinização, produzem mais grãos que as anteras menores, de alimentação (fig. 8). As anteras dos botões florais possuem mais grãos do que as anteras manipuladas, com e sem rostro (botões vs “com rostro” - $p < 0.05$; botões vs “sem rostro” - $p < 0.05$). Entretanto, não existe diferença na quantidade de pólen remanescente nas anteras entre os tratamentos “com rostro” e “sem rostro” (fig. 8).

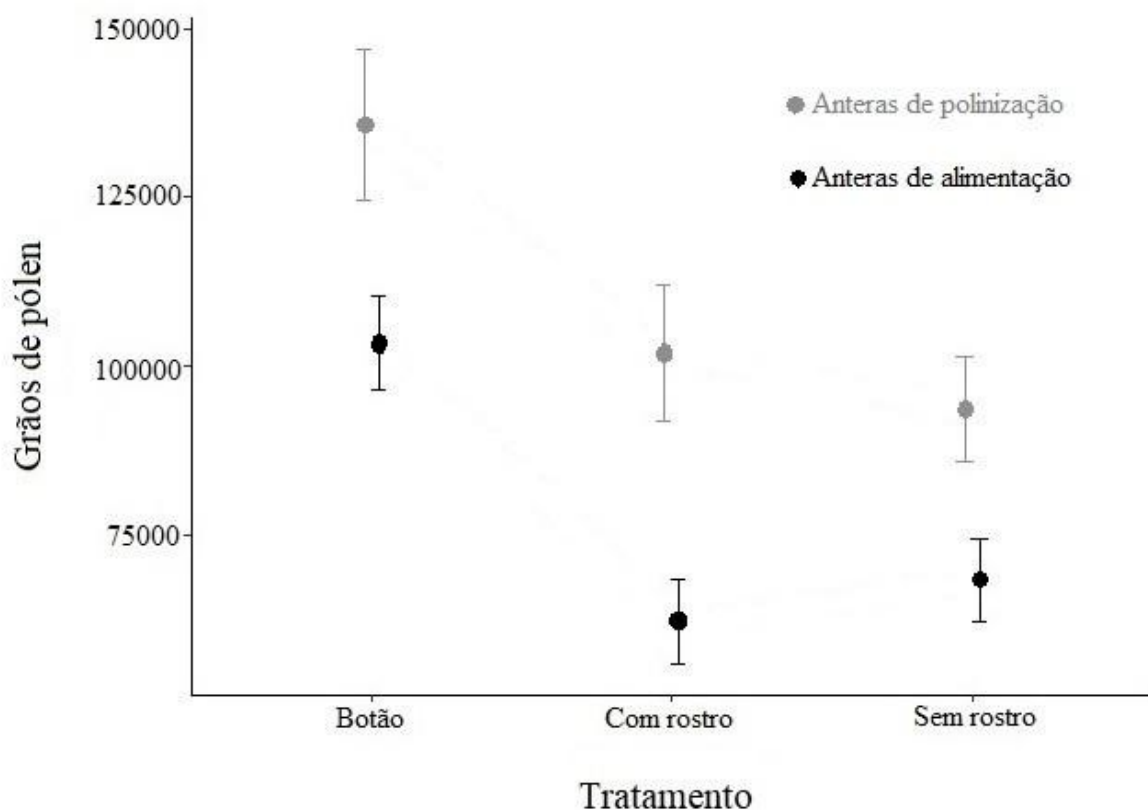


Figura 8 Número de grãos de pólen nas anteras de polinização e de alimentação nos três tratamentos: botão, com rostro após vibração e sem rostro após vibração.

Discussão

O rostro de ambos os tipos de anteras das flores de *Rhynchanthera grandiflora* apresenta uma estrutura e um padrão de desenvolvimento similar, mas uma diferença na velocidade de crescimento leva a um maior tamanho relativo do rostro nas anteras menores. Apesar disso, uma vez que a proporção de grãos de pólen remanescentes não difere entre as anteras, podemos afirmar que não houve uma liberação diferencial de pólen entre os dois tipos de anteras, e o rostro parece não restringir a quantidade de pólen liberado na simulação de uma visita.

Entre as angiospermas, anteras rostradas são relatadas em diferentes grupos, como em *Dyckia* (Bromeliaceae), *Govenia* (Orchidaceae), *Lasiopetaleae* (Malvaceae), *Rhamnus* (Rhamnaceae), *Senna* (Fabaceae), além de muitos gêneros de Melastomataceae (Irwin e Barneby 1982; Garcia-Cruz e Sosa 2005; Lima 2006; Bortoluzzi et al. 2007; Goldenberg et

al. 2015; Shepherd e Wilkins 2015; Bacci et al. 2016; Carvalho et al. 2016). Na família, essa condição é observada em tribos não relacionadas, como em Microlicieae, Marcetieae e Henriettea (Penneys et al. 2010, Goldenberg et al. 2015; Da Rocha et al. 2018). Na tribo Microlicieae, o rostro está presente em espécies com estames isomórficos, subisomórficos ou mesmo dimórficos, e seu comprimento varia entre as espécies, e pode variar entre os estames dimórficos de uma mesma flor (Romero 2003; Lima et al. 2014; Goldenberg et al. 2015; Bacci et al. 2016), como ocorre em *Rhynchanthera grandiflora* (Bacci et al. 2016).

Nessa espécie, as características estruturais da zona de deiscência observadas no rostro são semelhantes ao descrito para zonas de abscisão em plantas (Roberts et al. 2002), incluindo no processo de abertura da zona de deiscência em anteras longitudinais (Sanders et al. 2005). Nessa região, pouco antes da abertura da flor, a parede das células da zona de deiscência começa a se desintegrar (Sanders et al. 2005; Senatore et al. 2009). Nesse processo, sugere-se a ocorrência de morte celular programada (MCP) culminando na formação do lúmen do rostro. Os processos de MCP são importantes em diferentes eventos no ciclo de reprodução sexual das plantas (Wu e Cheung 2000), estando por exemplo, envolvidos na apresentação dos grãos de pólen durante a deiscência (Rogers 2005).

Além da zona de deiscência, ocorre uma ausência de cutícula na extremidade distal da antera, região do poro. Resultados semelhantes foram descritos em espécies do gênero *Miconia* (Cortez et al. 2014). Uma vez que a cutícula da planta funciona como uma barreira mecânica que diminui a perda de água pela superfície (Riederer e Schreiber 2001; Yeats e Rose 2013; Jetter e Riederer 2016; Bueno et al. 2019), sua ausência na região do poro deve possibilitar, após a abertura da flor, que a extremidade da antera se resseque rapidamente e o poro se abra (Cortez et al. 2014). Aparentemente, este é um processo amplamente difundido na família.

Aparentemente, o rostro não restringe a saída de pólen da antera e não proporciona uma economia de pólen na simulação de uma visita. No entanto, a diferença no tamanho relativo do rostro entre os tipos de anteras, sendo o rostro relativamente maior nas anteras de alimentação, leva-nos a acreditar que essa estrutura tenha influência na divisão de trabalho. Durante a vibração da abelha na flor, a antera de polinização deposita o pólen no dorso e na lateral da abelha, região que entra em contato com o estigma da flor; e as anteras de alimentação depositam o pólen na região ventral, onde a abelha frequentemente o remove e leva para o ninho (Vallejo-Marín 2009; Pinheiro et al. 2014; Pinheiro-Costa et al. 2018). Nesse contexto, levanta-se a hipótese de que o rostro promove uma deposição mais precisa do pólen dos dois tipos de anteras, nessas regiões mais específicas do corpo do polinizador,

de forma a ressaltar a divisão de trabalho. Além disso, o rostro pode mediar uma diferença no espalhamento dos grãos de pólen entre os tipos de anteras. Por exemplo, o rostro mais longo pode ter uma deposição mais específica, numa “mancha” menor do corpo do polinizador, quando comparado ao rostro mais curto.

Outra alternativa seria que a função do rostro em restringir diferencialmente a saída dos grãos de pólen entre os tipos de anteras ficasse evidente apenas com um acúmulo de visitas. A porcentagem de grãos removidos numa primeira visita por abelhas que vibram, varia de 18 a 50% do pólen disponível, dependendo das espécies de plantas e de polinizadores (Harder 1990a; King e Buchmann 1996; Kawai e Kudo 2009). Repetidas vibrações em uma flor permitem a remoção de mais pólen, mesmo sendo de forma decrescente (Kawai e Kudo 2009). Além disso, diferenças na disponibilidade de pólen nas flores são percebidas por abelhas grandes do gênero *Bombus* sp., que respondem, entre outras maneiras, com alteração na duração das visitas (Harder 1990b). Sendo que a diminuição da duração da vibração na flor resulta numa menor quantidade de pólen coletado pelo polinizador a cada visita (Kawai e Kudo 2009), dessa forma, as abelhas precisariam visitar mais plantas para obter todo o recurso necessário, favorecendo a dispersão dos grãos na população e a polinização cruzada.

Como as abelhas podem variar a vibração quanto a duração (Harder 1990b), e uma vez que é difícil medir a vibração da abelha no momento em que ela está agarrada às partes reprodutivas da planta (Vallejo-Marín 2019), a escova elétrica utilizada permitiu uma padronização desses parâmetros. Além disso, a frequência da escova está bem inserida na faixa de frequência de “buzz” das espécies *Xylocopa frontalis*, *Centris flavifrons* e *Eulaema nigrita*, que são importantes polinizadores de *Rhynchanthera grandiflora* (Renner 1989, 1990; Burkart et al. 2011). Contudo, seria válida a realização de um experimento utilizando, ao invés da vibração artificial, a própria vibração das abelhas nas flores, sendo este o método aplicado por Fan and Li (2016), por exemplo.

O entendimento da ontogenia e função do rostro é um passo importante para o conhecimento de uma possível estratégia que como a heteranteria, diminui o conflito gerado pela função dupla (reprodutiva e como recurso) do pólen, e promove a divisão de trabalho. A anatomia e ontogenia do rostro foram descritas pela primeira vez. E detalhes importantes de seu desenvolvimento como a zona de deiscência e a ausência de cutícula no poro foram aqui descritos. O rostro deve ser uma estrutura floral inovadora, adicionando uma nova função à antera.

Reconhecimento (s)

Agradecemos ao Laboratório de Morfologia, Microscopia e Imagem e ao Laboratório Multiusuário de Microscopia da Faculdade de Engenharia Química, ambos da Universidade Federal de Uberlândia. Nossos agradecimentos a Renata Trevizan Telles de Souza, pelo apoio no campo; a Larissa Chagas de Oliveira, a Mariana Ferreira Alves e a Uiara Costa Rezende, pelas instruções quanto ao processamento do material; e ao Núcleo de Estudos de Reprodução de Plantas, pelo aprendizado coletivo.

Literatura Citada

Alvares CA, JL Stape, PC Sentelhas, JLM Gonçalves, G Sparovek 2013 Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorologische Zeitschrift* 22:711-728.

Alvarenga PEF, RF Freitas, SC Augusto 2007 Diversidade de *Euglossini* (Hymenoptera: Apidae) em áreas de cerrado do triângulo mineiro, MG. *Bioscience Journal* 23:30-37.

Anderson, B, WW Cole, SCH Barrett 2005 Botany: Specialized bird perch aids cross-pollination. *Nature* 435:41.

Bacci LF, AFA Versiane, ALF Oliveira, R Romero 2016 Melastomataceae na RPPN do Clube Caça e Pesca Itororó, Uberlândia, MG, Brasil. *Hoehnea* 43:541-556.

Barrett SCH 2010 Darwin's legacy: the forms, function and sexual diversity of flowers. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* 365:351-368

Bortoluzzi RLC, STS Miotto, A Reis 2007 Novos registros de *Chamaecrista* Moench e *Senna* Mill. (Leguminosae- Caesalpinioideae-Cassieae) na flora sul-brasileira. *Iheringia Série Botânica* 62:121-130.

Bueno A, A Alfarhan, K Arand, M Burghardt, AC Deininger, R Hedrich, J Leide, P Seufert, S Staiger, M Riederer 2019 Effects of temperature on the cuticular transpiration barrier of two desert plants with water-spender and water-saver strategies. *Journal of Experimental Botany* 70:1613-1625.

Burkart A, K Lunau, C Schlindwein 2011 Comparative bioacoustical studies on flight and buzzing of neotropical bees. *Journal of Pollination Ecology* 6: 118-124.

Carvalho JDTD, JMDS Oliveira, CCD Freitas, MS Martins 2016 Stamen morphoanatomy of *Dyckia* Schult. f. (Bromeliaceae, Pitcairnioideae) species: new data for taxonomic use. *Acta Botanica Brasilica* 30: 389-400.

Cortez PA, APS Caetano, SM Carmello-Guerreiro, SP Teixeira 2014 Elucidating the mechanism of poricidal anther dehiscence in *Miconia* species (Melastomataceae). *Flora* 209:571-579.

Da Rocha MJR, PJF Guimarães, FA Michelangeli, JAN Batista 2018 Taxonomy of Marcetieae: A new neotropical tribe of Melastomataceae. *International Journal of Plant Sciences* 179:50-74.

De Luca PA, M Vallejo-Marín 2013 What's the 'buzz' about? The ecology and evolutionary significance of buzz-pollination. *Current Opinion in Plant Biology* 16:429–435.

Dellinger AS, DS Penneys, YM Staedler, L Fragner, W Weckwerth, J Schönenberger 2014 A specialized bird pollination system with a bellows mechanism for pollen transfer and staminal food body rewards. *Current Biology* 24:615-1619. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2014.05.056>

Fan YL, QJ Li 2016 Tail-like anther crest aids pollination by manipulating pollinator's behaviour in a wild ginger. *Scientific reports* 6:22340.

Fritsch PW, F Almeda, SS Renner, AB Martins, BC Cruz 2004 Phylogeny and circumscription of the near-endemic Brazilian tribe Microlicieae (Melastomataceae). *American Journal of Botany* 91:1105-1114.

Friis EM, KR Pedersen, PR Crane 2006 Cretaceous angiosperm flowers: innovation and evolution in plant reproduction. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 232: 251-293.

Garcia-Cruz J, V Sosa 2005 Phylogenetic relationships and character evolution in *Govenia* (Orchidaceae). *Botany*, 83:1329-1339.

Goldenberg R, L Bacci, JW Moraes 2015 A tribo Microlicieae Triana (Melastomataceae) no estado do Paraná. *Rodriguésia-Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro* 66:155-165.

Han Y, C Dai, CF Yang, QF Wang, TJ Motley 2008 Anther appendages of *Incarvillea* trigger a pollen-dispensing mechanism. *Annals of botany* 102:473-479.

Harder LD 1990a Pollen removal by bumble bees and its implications for pollen dispersal. *Ecology* 71:1110-1125.

Harder LD 1990b Behavioral responses by bumble bees to variation in pollen availability. *Oecologia* 85:41–47

Harder LD, RMR Barclay 1994 The functional significance of poricidal anthers and buzz pollination: controlled pollen removal from *Dodecatheon*. *Functional Ecology* 8:509–517

Hargreaves AL, LD Harder, SD Johnson 2009 Consumptive emasculation: the ecological and evolutionary consequences of pollen theft. *Biological Reviews* 84:259–276.

Irwin HS, RC Barneby 1982 The American Cassiinae. A Synoptical Revision of Leguminosae, Tribe Cassieae, Subtribe Cassiinae in New World. *Memoirs of the New York Botanical Garden* 35:1-454.

Jetter R, M Riederer 2016 Localization of the transpiration barrier in the epi- and intracuticular waxes of eight plant species: water transport resistances are associated with fatty acyl rather than alicyclic components. *Plant physiology* 170:921-934.

Johansen DA 1940 *Plant microtechnique*. McGraw-Hill Book Company, Inc. New York and London.

Kawai Y, G Kudo 2009 Effectiveness of buzz pollination in *Pedicularis chamissonis*: significance of multiple visits by bumblebees. *Ecol Res* 24:215–223

King MJ, SL Buchmann 1996 Sonication dispensing of pollen from *Solanum laciniatum* flowers. *Functional Ecology* 10:449–456.

Lima RB 2006 Flora de Grão-Mogol, Minas Gerais: Rhamnaceae. *Boletim de Botânica* 24:35-37.

Lima LFG, JUM Santos, AS Rosário, FA Baumgratz 2014 Melastomataceae em formações costeiras de restingas no Pará, Brasil. *Acta Amazonica* 44:45-58.

Luo Z, D Zhang, SS Renner 2008 Why two kinds of stamens in buzz-pollinated flowers? Experimental support for Darwin's division-of-labour hypothesis. *Functional Ecology* 22:794–800.

Luo Z, L Gu, D Zhang 2009 Intrafloral differentiation of stamens in heterantherous flowers. *Journal of Systematics and Evolution* 47:43–56.

Michelangeli FA, PJ Guimaraes, DS Penneys, F Almeda, R Kriebel 2013 Phylogenetic relationships and distribution of new world Melastomeae (Melastomataceae). *Botanical journal of the Linnean Society* 171:38-60.

Muller F 1883 Two kinds of stamens with different functions in the same flower. *Nature* 27:364–365.

O'Brien TP, N Feder, ME McCully 1964 Polychromatic staining of plant cells walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59:368–373.

Penneys DS, FA Michelangeli, WS Judd, F Almeda 2010. Henrietteae (Melastomataceae): a new neotropical berry-fruited tribe. *Systematic Botany* 35:783-800.

Pinheiro M, MC Gaglianone, CEP Nunes, MR Sigrist, IA Santos 2014 Polinização por abelhas. Pages 205-233 in AR Rech, K Agostini, PE Oliveira, IC Machado, eds. *Biologia da Polinização*. Projeto Cultural, Rio de Janeiro.

Pinheiro-Costa BK, JN Mesquita-Neto, JO Rego, C Schlindwein 2018 Trade off between quantity and size of pollen grains in the heterandrous flowers of *Senna pendula* (Fabaceae). *Acta Botanica Brasilica* 32:446-453. doi: 10.1590/0102-33062018abb0132.

Radford AE, WC Dickison, JR Massey, CR Bell 1974 *Vascular Plant Systematics* Harper and Row. New York, USA.

Renner SS 1989 A survey of reproductive biology in Neotropical Melastomataceae and Memecylaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 76:496-518.

Renner SS 1990 A revision of *Rhynchanthera* (Melastomataceae). *Nordic Journal of Botany* 9: 601-630.

Riederer M, L Schreiber 2001 Protecting against water loss: analysis of the barrier properties of plant cuticles. *Journal of experimental botany* 52:2023-2032.

Roberts JA, KA Elliott, ZH Gonzalez-Carranza 2002 Abscission, dehiscence, and other cell separation processes. *Annual review of plant biology* 53:131-158.

Rogers HJ 2005 Cell death and organ development in plants. *Current topics in developmental biology* 71:225-261.

Romero R 2003 Revisão taxonômica de *Microlicia* sect. *Chaetostomoides* (Melastomataceae). *Revista Brasileira de Botânica* 26:429-435.

Rosa AG, I Schiavini 2006 Estrutura da comunidade arbórea em um remanescente florestal urbano (Parque do Sabiá, Uberlândia, MG). *Bioscience Journal* 22:151-162.

Sanders PM, AQ Bui, BH Le, RB Goldberg 2005 Differentiation and degeneration of cells that play a major role in tobacco anther dehiscence. *Sexual Plant Reproduction*, 17:219-241.

- Schlindwein C, D Wittmann, CF Martins, A Hamm, JA Siqueira, D Schiffler, IC Machado 2005 Pollination of *Campanula rapunculus* L. (Campanulaceae): How much pollen flows into pollination and into reproduction of oligolectic pollinators?. *Plant Systematics and Evolution* 250:147-156. doi: 10.1007/s00606-004-0246-8
- Senatore A, CP Trobacher, JS Greenwood 2009 Ricinosomes predict programmed cell death leading to anther dehiscence in tomato. *Plant physiology* 149: 775-790.
- Shepherd KA, CF Wilkins 2015 A revision of species from the tribe Lasiopetaleae (Byttnerioideae: Malvaceae) with rostrate anthers. *Nuytsia* 25:171-189.
- Vallejo-Marín M, JS Manson, JD Thomson, SCH Barrett 2009 Division of labour within flowers: heteranthy, a floral strategy to reconcile contrasting pollen fates. *J Evolution Biol* 22:828-839.
- Vallejo-Marín M, EM Silva, RD Sargent, SCH Barret 2010 Trait correlates and functional significance of heteranthy in flowering plants. *New Phytol* 188:418-425.
- Vallejo-Marín M 2019 Buzz pollination: studying bee vibrations on flowers. *New Phytologist*. <https://doi.org/10.1111/nph.15666>
- Velloso MSC, VLG Brito, APS Caetano, R. Romero 2018 Anther specializations related to the division of labor in *Microlicia cordata* (Spreng.) Cham. (Melastomataceae). *Acta Botanica Brasilica* 32: 349-358.
- Vogel S 1978 Evolutionary shifts from reward to deception in pollen flowers. Pages 89-96 in AJ Richards, ed. *The pollination of flowers by insects*. Academic Press, London.
- Walker-Larsen J, LD Harder 2000 The evolution of staminodes in angiosperms: patterns of stamen reduction, loss, and functional re-invention. *American Journal of Botany* 87:1367–1384.
- Westerkamp C 1996 Pollen in Bee-Flower Relations: Some Considerations on Melittophily. *Bot. Acta* 109:325-332.
- Westerkamp C 1997 Flowers and bees are competitors – not partners. Towards a new understanding of complexity in specialised bee flowers. *Acta Horticulturae* 437:71-74.
- Wu H, AY Cheung 2000 Programmed cell death in plant reproduction. In E Lam E, H Fukuda, J Greenberg, eds. *Programmed Cell Death in Higher Plants*. Springer, Dordrecht.
- Yeats TH, JK Rose 2013 The formation and function of plant cuticles. *Plant physiology* 163:5-20.

ANEXO 1: Cópia das normas utilizadas no artigo, exigidas pela revista
International Journal of Plant Sciences.

<https://www.journals.uchicago.edu/journals/ijps/instruct>

General Specifications

Manuscripts that do not follow *International Journal of Plant Sciences* style will be subject to further revision. Please consult the List of Abbreviations and Symbols that may be used without definition in *IJPS*. Manuscripts should be entirely double spaced and arranged in the following sequence:

Title Page

Include manuscript title, authors, affiliations, a shortened title that does not exceed 55 characters (including names of authors) for use as a running head, and four to six keywords.

Abstract

Authors, please note that the format of abstracts has changed.

IJPS requires an abstract in four sections (no citations, no more than 300 words), written in the following format:

- Premise of the Research (Why was the investigation done? Why is it important?)
- Methodology
- Pivotal Results
- Conclusions (What should the readers take from this investigation?)

Please note: In manuscripts where the methods are obvious from the title (e.g., "microscopical investigation of cell wall morphology"), the Methodology section may be omitted.

Text: Manuscripts must meet the following formatting before review:

- All sections should be **double spaced**.
- **Continuous line numbering** must be applied to the manuscript to assist reviewers
- Include **page numbers** on all pages.

Introduction. The context for the investigation and the author's hypothesis.

Material and Methods. Sufficient information should be provided for replication of the results by a competent colleague.

Results. Provide important results first. Data should be presented in SI units in the form of tables and figures cited in numerical sequence. Include statistical analyses if necessary. *Literature citations and discussion are not allowed in the Results section.* Please note also that figures and tables should be referred to parenthetically; for example, avoid writing "Table 1 gives. . ." or "Figure 3 shows . . ."

Discussion. This section includes important results of the investigation and the pertinent literature.

Acknowledgment(s).

Literature cited. Complete information must be provided, including publisher and location (city and state/country) for articles cited in the Introduction, Material and Methods, and Discussion.

Journal article

Platt-Aloia KM, WW Thomson, RE Young 1980 Ultrastructural changes in the walls of ripening avocados: transmission, scanning and freeze fracture microscopy. *Bot Gaz* 141:366-373.

Book

Berlyn GP, JP Miksche 1976 *Botanical microtechnique and cytochemistry*. Iowa State University Press, Ames.

Book chapter

Evert RF, RJ Mierzwa 1986 Pathway(s) of assimilate movement from mesophyll cells to sieve tubes in the *Beta vulgaris* leaf. Pages 419-432 in J Cronshaw, RT Giaguinta, WJ Lucas, eds. *Plant biology*. Vol 1. Phloem transport. Liss, New York.

Monograph

Fritts HC 1969 *Bristlecone pine in the White Mountains of California*. Papers of the Laboratory of Tree-Ring Research, no. 4. University of Arizona Press, Tucson.

Gentry HS 1972 *The agave family in Sonora*. USDA Handbook 399. Washington, DC.

Thesis

Anderson CD 1963 *A study of the development of the maize mutant *Branched-Silkless (bd)**. PhD diss. Purdue University, West Lafayette, IN.

Footnotes

Type footnotes double spaced on a separate page, and number them consecutively; one footnote should contain definitions of all abbreviations when abbreviations are numerous.

Tables

Type tables double spaced, each on a separate page, and number them consecutively in accordance with their appearance in the text. Related data or observations should be arranged in columns. Include table title, headings, body of data, and notes numbered consecutively and keyed to specific parts of the table. For further instructions on the preparation of tables, consult the Guidelines for Tables.

Figures

Figures should be designed to fit the size of an *IJPS* page (17.5 × 23 cm, 6.75 × 9 inches) or column width (8.25 cm, 3.25 inches). Letters and numerals must be large enough to accommodate reduction and be legible. Photographs should be carefully cropped and evenly arranged in a plate to maximize space use. Figures must be numbered consecutively according to their appearance in text. *Plates should be numbered in the order that they are cited in the text, and individual figures making up the plate should be referred to alphabetically*. Graphs and figures should be of professional quality and should not include typed entries. For further instructions on the preparation of figures, consult the Guidelines for Artwork.

Figure legends

Typed double spaced on a separate page; self-explanatory without reference to the text.