



Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro  
Escola Nacional de Botânica Tropical  
Programa de Pós-graduação em Botânica

Tese de Doutorado

**Caracterização anatômica do desenvolvimento da calosidade na pétala estandarte em flores de espécies de *Dioclea* Kunth. (Fabaceae-Diocleinae)**

Aliny Férras Peçanha

Rio de Janeiro  
2014



Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro  
Escola Nacional de Botânica Tropical  
Programa de Pós-graduação em Botânica

**Caracterização anatômica do desenvolvimento da calosidade na pétala estandarte em flores de espécies de *Dioclea* Kunth. (Fabaceae-Diocleinae)**

**Aliny Férras Peçanha**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica, Escola Nacional de Botânica Tropical, do Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Botânica.

Claudia Franca Barros  
Luciano Paganucci de Queiroz  
Haroldo Cavalcante de Lima

Rio de Janeiro  
2014

Caracterização anatômica do desenvolvimento da calosidade na pétala estandarte em flores de espécies de *Dioclea* Kunth. (Fabaceae-Diocleinae)

**Aliny Férras Peçanha**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Botânica da Escola Nacional de Botânica Tropical, Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro - JBRJ, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor.

Aprovada por:

Prof. Dr<sup>a</sup>. Claudia Franca Barros (Orientador) \_\_\_\_\_

Prof. Dr<sup>a</sup>. Cecília Gonçalves Costa \_\_\_\_\_

Prof. Dr<sup>a</sup>. Karen Lúcia Gama De Toni \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Ricardo Cardoso Vieira \_\_\_\_\_

Prof. Dr<sup>a</sup>. Denise Espellet Klein \_\_\_\_\_

em 11/03/2014

Rio de Janeiro  
2014

Peçanha, Aliny Férras.

P364c      Caracterização anatômica do desenvolvimento da calosidade na pétala estandarte em flores de espécies de *Dioclea* Kunth. (Fabaceae-Diocleinae) / Aliny Férras Peçanha. – Rio de Janeiro, 2014.

xv, 73f. : il. ; 28 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro / Escola Nacional de Botânica Tropical, 2014.

Orientadora: Claudia Franca Barros.

Co-orientadores: Luciano Paganucci de Queiroz e Haroldo Cavalcante de Lima.

Bibliografia.

1. Fabaceae. 2. Diocleinae. 3. *Dioclea*. 4. Anatomia floral. 5. Polinização. I. Título. II. Escola Nacional de Botânica Tropical.

CDD 582.0463

*Se eu quiser falar com Deus  
Tenho que ficar a sós  
Tenho que apagar a luz  
Tenho que calar a voz  
Tenho que encontrar a paz  
Tenho que folgar os nós  
Dos sapatos, da gravata  
Dos desejos, dos receios  
Tenho que esquecer a data  
Tenho que perder a conta  
Tenho que ter mãos vazias  
Ter a alma e o corpo nus  
Se eu quiser falar com Deus  
Tenho que aceitar a dor  
Tenho que comer o pão  
Que o diabo amassou  
Tenho que virar um cão  
Tenho que lambar o chão  
Dos palácios, dos castelos  
Suntuosos do meu sonho  
Tenho que me ver tristonho  
Tenho que me achar medonho  
E apesar de um mal tamanho  
Alegrar meu coração  
Se eu quiser falar com Deus  
Tenho que me aventurar  
Tenho que subir aos céus  
Sem cordas pra segurar  
Tenho que dizer adeus  
Dar as costas, caminhar  
Decidido, pela estrada  
Que ao findar vai dar em nada  
Nada, nada, nada, nada  
Nada, nada, nada, nada  
Nada, nada, nada, nada  
Do que eu pensava encontrar*

**Gilberto Gil**

*Aos ricos desafios da vida  
A fé que me guiou  
As pessoas maravilhosas,  
minha mãe Tilda  
e meus amados  
Hélio Ricardo e meu filho Artur*  
**DEDICO**

## Agradecimentos

Agradeço a *Deus* pelos dons a mim concedidos que me fizeram concluir mais uma jornada!

A minha mãe Dona Tilda pelo exemplo de força e coragem diante dos obstáculos, também ao meu pai Jorge e meus irmãos Úrsula e Matheus pela união e torcida para que esse projeto dê certo.

A minha orientadora Claudia Franca Barros por sua generosidade, coragem e confiança no meu trabalho mesmo sem me conhecer direito e de ter me acolhido num momento bem complicado da minha vida.

Ao Luciano Paganucci de Queiroz e ao Haroldo Cavalcante de Lima pela oportunidade de continuar o trabalho, pelas sugestões tanto do material de estudo quanto na redação do texto, pelas coletas do material de estudo e pela prontidão nos momentos em que necessitava resolver todas as questões que envolveram a taxonomia do grupo de estudo.

A Dona Cecília Gonçalves Costa e a Karen Lúcia da Gama De Toni pelas valiosas sugestões em anatomia floral e na parte do desenvolvimento da estrutura calosa e pelas alegres trocas de experiências dos nossos filhos e da bisneta da Dona Cecília.

Agradeço a toda equipe da Pós-graduação em Botânica do Instituto de Pesquisas do Jardim Botânico do Rio de Janeiro. A equipe da coordenação anterior na pessoa da Dr<sup>a</sup> Renata Perpétuo Reis e a coordenação atual representada pelo Prof. Anibal Alves de Carvalho Junior, a Prof<sup>a</sup> Ariane Luna Peixoto pela confiança em mim depositada. À secretária Hevelise Peregrino, ao Marquinhos pela disponibilidade em me ajudar e sempre me atender a qualquer momento.

A bolsa Capes-JBRJ pelos auxílios concedidos.

As *Dioclea* e todas as experiências que passei como consequência do seu estudo, até mesmo as mais difíceis! Todas me fortaleceram!

A todas as pessoas que sem me conhecer, nos lugares em que estive para coletar e observar o comportamento das abelhas na flor de *Dioclea*, me ajudaram de uma forma muito generosa, à Maria Aparecida (Reserva RECOR, IBGE), Celso, Zé Maia, Totonho, Adilson e o seu filho Matheus (Reserva Biológica de Poço das Antas), à Clemira, Vitor Becker e ao Ronilson pela acolhida na RPPN Serra Bonita (Camacan - Bahia). À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Guadalupe E. Licon de Macedo da UESB (Jequié, Bahia), a Glória, ao Prof. André Amorim (CEPEC) por ter me orientado na busca pelas *Diocleas* em Ilhéus (Bahia). Ao

Marlon (UEFS) por ter me acolhido em Feira de Santana, ao Cosme pelas expedições de campo e ao Jeferson por ter me ajudado encontrar as espécies de *Dioclea* dentro da UEFS e a subir quase 10 metros de escada todos os dias! Ao Carlos Martins da APA Macaé de Cima por ter me levado a *Dioclea* e ter me apresentado ao casal Isabel e David Muller. Ao Edvando Ribeiro por toda a ajuda e atenção durante a expedição em Santo Aleixo (RJ) e a Bruno Ary pela ajuda prestada no Ceará.

A amiga Simone Caroline Cappellari (Harvard University Herbaria) pelas experiências compartilhadas com as abelhas, no trabalho de campo em Brasília (Reserva RECOR), nos infindáveis diálogos tanto por e-mail quanto pessoalmente e também mais tarde com as experiências sobre a maternidade, todas essas experiências me proporcionaram momentos muito felizes.

A Juliana Hipólito e a Suzana no curso sobre polinização na UNICAMP e a Talita Reis que me acolheu em sua república.

Agradeço especialmente a Isabel e ao David Muller (*in memoriam*) por terem me acolhido em sua RPPN do Sítio Hum New Bacus em Mury - Macaé de Cima por toda assistência e conversas à noite próximo ao fogão de lenha, ao delicioso vinho e alimento servido à noite após a minha chegada do campo, muito obrigada mesmo pelo carinho espontâneo! E ao Carlinhos por ter me ajudado a chegar na minha planta e com a coleta das abelhas. Aos cães da Izabel e do David, o "bidu" e a "nina" que me acompanhavam todos os dias ao campo e ficavam comigo no trabalho, que momento mágico em minha vida!!!!

Ao Alfredo por ter me ajudado a chegar numa espécie de *Dioclea* em Lima Duarte (Minas Gerais).

A amiga Rosani do Carmo Arruda (UFMS) pela amizade e pelo conhecimento sobre anatomia passados a mim, pelas ricas oportunidades de trabalho com a anatomia, a você todo o meu carinho e amizade eternas.

Especialmente aos amigos Elaine Zózimo e Rogério Figueiredo, pela amizade, confiança, por todos os momentos alegres que vocês me proporcionaram! Pela disposição em me ajudar em todos os momentos da realização deste trabalho, pelos ensinamentos das técnicas e manuseio dos equipamentos.

A amiga Simone Petrucci Mendes pelo companheirismo no laboratório, até mesmo depois do horário!

Aos amigos do Laboratório de Botânica Estrutural, Monique Neves ("tia nique"), Alessandra Guimarães, Camila, Felipe, Fernanda Mazulo, Bruna Luna, Thaysa, Warlen, Reynaud, Veronica e Deise.



Aos amigos da Pós-graduação Eline Martins, Jordana Néri, Cecília Barroso, Karina Hmeljevsk e Nathalia Braga pela amizade e os momentos descontraídos nas disciplinas cursadas em comum.

A Amanda Garcez do setor de microscopia eletrônica de varredura do Museu Nacional (UFRJ) pelas imagens realizadas e pelo conhecimento sobre a microscopia de varredura.

Ao diretores do colégio em que trabalhava Pery e Ana por terem me ajudado nos momentos em que precisava estar no laboratório.

Ao meu esposo Hélio Ricardo Xavier Pimentel pelo companheirismo, ao incentivo a continuar o curso mesmo diante das dificuldades! Pela paciência, pelos diálogos sobre qualquer assunto, até sobre anatomia, por toda ajuda em encontrar o material bibliográfico mais difícil e por todos os cuidados comigo durante a maternidade até o presente momento e com o nosso filho Artur Peçanha Pimentel cuja existência me encheu de ternura, amor e felicidade, vocês me fizeram ser uma pessoa mais prática e presente na vida! Obrigada!!

## Resumo

(Caracterização anatômica do desenvolvimento da calosidade na pétala estandarte em flores de espécies de *Dioclea* Kunth. Fabaceae-Diocleinae). *Dioclea* é representada no Brasil por 32 espécies subordinadas nas seções *Platylobium*, *Pachylobium*, *Macrocarpon* e *Dioclea*, distribuídas em diferentes domínios fitogeográficos. O gênero é polifilético, formado por dois clados: *Pachylobium* integrado por espécies das seções *Platylobium*, *Pachylobium* e *Macrocarpon* e *Dioclea* integrado por espécies da seção *Dioclea*. As flores nas espécies de *Dioclea* consistem de uma pétala estandarte expandida para atração visual e pétalas inferiores que permanecem mais ou menos na posição de botão, formando um complexo constituído pela ala e quilha que encerra os órgãos reprodutivos. A pétala estandarte apresenta o guia de língua usado por abelhas que polinizam tais flores, constituído por um canal delimitado por duas protuberâncias, referidas sob o termo calo em publicações taxonômicas. O calo foi importante para a classificação das seções tradicionalmente aceitas, bem como para as análises filogenéticas morfológicas do grupo, entretanto existem divergências quanto a sua ocorrência (ausente/presente) e aspecto (desenvolvido/vestigial) devido ao emprego somente do critério visual nas observações. Na polinização a estrutura é utilizada por abelhas do gênero *Centris* como ponto de apoio para fixação do aparelho bucal garantindo maior eficiência na polinização. Objetivou-se responder: como é a morfologia e anatomia da calosidade e qual é a sua distribuição entre as seções de *Dioclea*? Ocorre a condição ausente/vestigial para o calo? Como é o seu desenvolvimento? Existe correlação entre a ocorrência da calosidade e o tipo de polinização? Foi caracterizada nas seções *Platylobium*, *Pachylobium* e *Dioclea* a morfologia e a anatomia do calo (onze espécies) e o seu desenvolvimento (quatro espécies) sob microscopia óptica e eletrônica de varredura e análises estatísticas foram empregadas. Dois agrupamentos foram obtidos a partir da análise combinada dos caracteres morfológicos e anatômicos, o primeiro incluindo as espécies da seção *Pachylobium* caracterizada pela presença de calo conspícuo, localizado em posição central, próximo da porção mediana da pétala, células epidérmicas poligonais alongadas, colênquima lacunar no mesofilo abaxial e por cinco ou mais camadas de colênquima anelar no mesofilo adaxial; O segundo por espécies das seções *Platylobium* e *Dioclea* caracterizadas pela presença de células epidérmicas poligonais, colênquima anelar no mesofilo abaxial e menos de cinco camadas de colênquima anelar no mesofilo adaxial do calo. Diferenças morfológicas separaram a seção *Platylobium* (calo conspícuo, localizado em posição central, próximo a porção mediana da pétala) da seção *Dioclea* (calo inconspícuo localizado em posição basal na pétala). O estudo do desenvolvimento revelou uma origem única para calo inconspícuo (*D. lasiophylla*) e conspícuo (*D. bicolor*, *D. grandiflora* e *D. sclerocarpa*), sendo formados por divisões no meristema fundamental adaxial no estágio 1 do botão floral. No calo inconspícuo o meristema se diferencia em camadas de parênquima e uma camada de colênquima adjacente a epiderme uniestratificada; No calo conspícuo ocorre a diferenciação de colênquima adjacente a epiderme pluriestratificada. Divisões no meristema se estendem aos estágios mais tardios no calo conspícuo de *D. grandiflora* e *D. sclerocarpa* (*Pachylobium*) produzindo camadas adicionais de colênquima que tornam o calo mais especializado ao modo particular de polinização realizado pela abelha *Centris*.

Palavras-chaves: Fabaceae-Diocleinae, *Dioclea*, calo na pétala estandarte, caracterização anatômica e do desenvolvimento, polinização.

## Abstract

(Anatomical characterization of the development of callus on the standard petal flower species *Dioclea* Kunth. Fabaceae-Diocleinae). *Dioclea* is represented in Brazil by 32 species subordinate in sections *Platylobium*, *Pachylobium*, *Dioclea* and *Macrocarpon* distributed in different phytogeographical domains. The genus is polyphyletic, consisting of two clades: *Pachylobium* composed of species of sections *Platylobium*, *Pachylobium* and *Macrocarpon* and *Dioclea* composed of species of section *Dioclea*. The flowers of the *Dioclea* species consist of a standard petal expanded for visual attraction and lower petals that remain more or less in the button position, forming a complex consisting of the wing and keel that closing the reproductive organs. The standard petal presents the tongue guide used by bees that pollinate these flowers, consisting of a channel delimited by two protrusions, referred under the term callus in taxonomic publications. Callus was important for the classification of sections traditionally accepted as well as the morphological phylogenetic analysis of the group, however there are divergences in its occurrence (absent /present) and aspect (developed/vestigial) due to the employment only of visual criteria in the observations. In pollination the structure is used by bees of the genus *Centris* as support for attachment of mouthparts ensuring greater efficiency in pollination. This study aimed to answer: how is the morphology and anatomy of callus and what is their distribution among sections *Dioclea*? Occurs absent/vestigial condition for callus? How is your development? There is a correlation between the occurrence of callus and the type of pollination? Was characterized in sections *Platylobium*, *Pachylobium* and *Dioclea* the morphology and anatomy of the callus (eleven species) and development (four species) under optical and scanning electron microscopy and statistical analyzes were employed. Two groups were obtained from the combined analysis of morphological and anatomical characters, the first including species of *Pachylobium* section characterized by the presence of conspicuous callus, centrally located, close to the middle portion of the petal, epidermal cells elongated polygonal lacunar collenchyma in the abaxial mesophyll and five or more layers collenchyma annular in the adaxial mesophyll; The second comprises species from sections *Platylobium* and *Dioclea* characterized by the presence of polygonal epidermal cells, annular collenchyma in the abaxial mesophyll and less than five layers of annular collenchyma in the adaxial mesophyll callus. Morphological differences separated the *Platylobium* section (conspicuous callus, centrally located, close to the middle portion of the petal) of *Dioclea* section (inconspicuous callus on basal position on the petal). The study of development revealed a single origin for inconspicuous callus (*D. lasiophylla*) and conspicuous (*D. bicolor*, *D. grandiflora* and *D. sclerocarpa*), being formed by divisions in the adaxial meristem in stage 1 floral buds. At the inconspicuous callus the meristem differentiates into layers of parenchyma and only one layer of collenchyma adjacent to the epidermis unistratified. On conspicuous callus differentiation of collenchyma occurs adjacent to the epidermis pluriestratified. Divisions in the meristem extend to later stages in conspicuous callus *D. grandiflora* and *D. sclerocarpa* (*Pachylobium*) producing additional layers of collenchyma which make it the most specialized callus to the particular mode of pollination performed by bees *Centris*.

Keywords: Fabaceae-Diocleinae, *Dioclea*, callus on the standard petal, anatomical and developmental characterization, pollination.

## Sumário

DEDICATÓRIA.....	vi
AGRADECIMENTOS.....	vii
RESUMO.....	x
ABSTRACT .....	xi
SUMÁRIO.....	xii
Lista de tabelas .....	xiii
Lista de figuras .....	xiv
INTRODUÇÃO GERAL .....	1
ARTIGO I – The role of the callus on standard petal of <i>Dioclea</i> Kunth. (Leguminosae-Papilionoideae-Diocleinae): How petal anatomy can contribute to the understand pollination and the group phylogeny?.....	10
Resumo.....	11
Introdução.....	12
Material e Métodos .....	14
Resultados.....	17
Discussão e Conclusões.....	22
Referências.....	43
ARTIGO II – Desenvolvimento do calo na pétala estandarte em espécies de <i>Dioclea</i> Kunth. (Leguminosae, Papilionoideae, Diocleinae).....	47
Resumo.....	48
Introdução.....	49
Material e métodos.....	51
Resultados.....	53
Discussão .....	63
Conclusão .....	66
Referências .....	67
CONCLUSÕES GERAIS .....	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	71

## Lista de tabelas

### INTRODUÇÃO GERAL

Tabela 1. Seções e espécies de <i>Dioclea</i> da flora brasileira .....	2
---	---

### ARTIGO I

Tabela 1. Espécies de <i>Dioclea</i> selecionadas para o estudo.....	26
Tabela 2. Caracteres florais relacionados com a exposição dos órgãos reprodutivos em espécies de <i>Dioclea</i> .....	27
Tabela 3. Sumário das variações morfológicas interespecíficas.....	28
Tabela 4. Variações nos caracteres da célula epidérmica no terço médio da pétala e do calo.....	29
Tabela 5. Variações nos caracteres do mesofilo na região do calo e do canal.....	30
Tabela 6. Caracteres morfológicos e anatômicos usados na análise de agrupamento.....	31

### ARTIGO II

Tabela 1. Espécies selecionadas, aspecto do calo e vouchers.....	51
Tabela 2. Estágios dos botões de espécies de <i>Dioclea</i> de acordo com o seu comprimento em milímetros.....	52

## Lista de figuras

### INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1. Clado Milletiíode ou Milletiíode-Phaseolóide (Queiroz 2009).....	1
Figura 2. Filogenia morfológica de espécies de <i>Dioclea</i> proposta por Queiroz <i>et al.</i> 2003 .....	3
Figura 3. Prefloração imbricada das flores papilionáceas em <i>Dioclea</i> .....	4
Figura 4. Flores do tipo quilha de espécies de <i>Dioclea</i> (seção <i>Pachylobium</i> ).....	6

### ARTIGO I

Figura 1. Sítios de coleta das espécies analisadas.....	34
Figura 2. Medidas em secção transversal da porção mediana do calo.....	35
Figura 3. Linha de grade.....	35
Figuras 4-31. Exposição dos órgãos reprodutivos de espécies de <i>Dioclea</i> .....	36
Figuras 32-47. Morfologia da pétala e anatomia do mesofilo do calo e do canal em espécies de <i>Dioclea</i> .....	37
Figuras 48-70. Morfologia da pétala e anatomia do mesofilo do calo e do canal em espécies de <i>Dioclea</i> .....	38
Figuras 71-95. Epiderme na região do terço médio da pétala estandarte e do calo em espécies de <i>Dioclea</i> .....	39
Figuras 96-115. Epiderme na região do terço médio da pétala estandarte e do calo em espécies de <i>Dioclea</i> .....	40
Figura 116. Dendrograma de agrupamento dos caracteres combinados de espécies de <i>Dioclea</i> ..	41
Figura 117. Comportamento das abelhas <i>Centris</i> e <i>Xylocopa</i> na flor e os danos morfológicos e anatômicos na pétala estandarte de espécies de <i>Dioclea</i> .....	42

### ARTIGO II

Figuras 1-25. Desenvolvimento do calo em <i>D. lasiophylla</i> .....	55
--	----

Figuras 26-50. Desenvolvimento do calo em <i>D. bicolor</i> .....	57
Figuras 51-76. Desenvolvimento do calo em <i>D. grandiflora</i> .....	59
Figuras 77-102. Desenvolvimento do calo em <i>D. sclerocarpa</i> .....	61

## Introdução

A tribo Phaseoleae (Papilionoideae) apresenta o maior número de gêneros dentre as Leguminosae (Varela *et al.* 2004). Consiste em oito subtribos dentre elas Diocleinae (Lackey 1981). As Diocleinae são parte do clado Millettióide-Phaseolóide, um dos quatro cladogramas bem sustentados das Papilionoideae (Figura 1) (Schrire *et al.* 2005; Queiroz 2009), com 13 gêneros (Varela *et al.* 2004), dentre eles *Dioclea* Kunth.

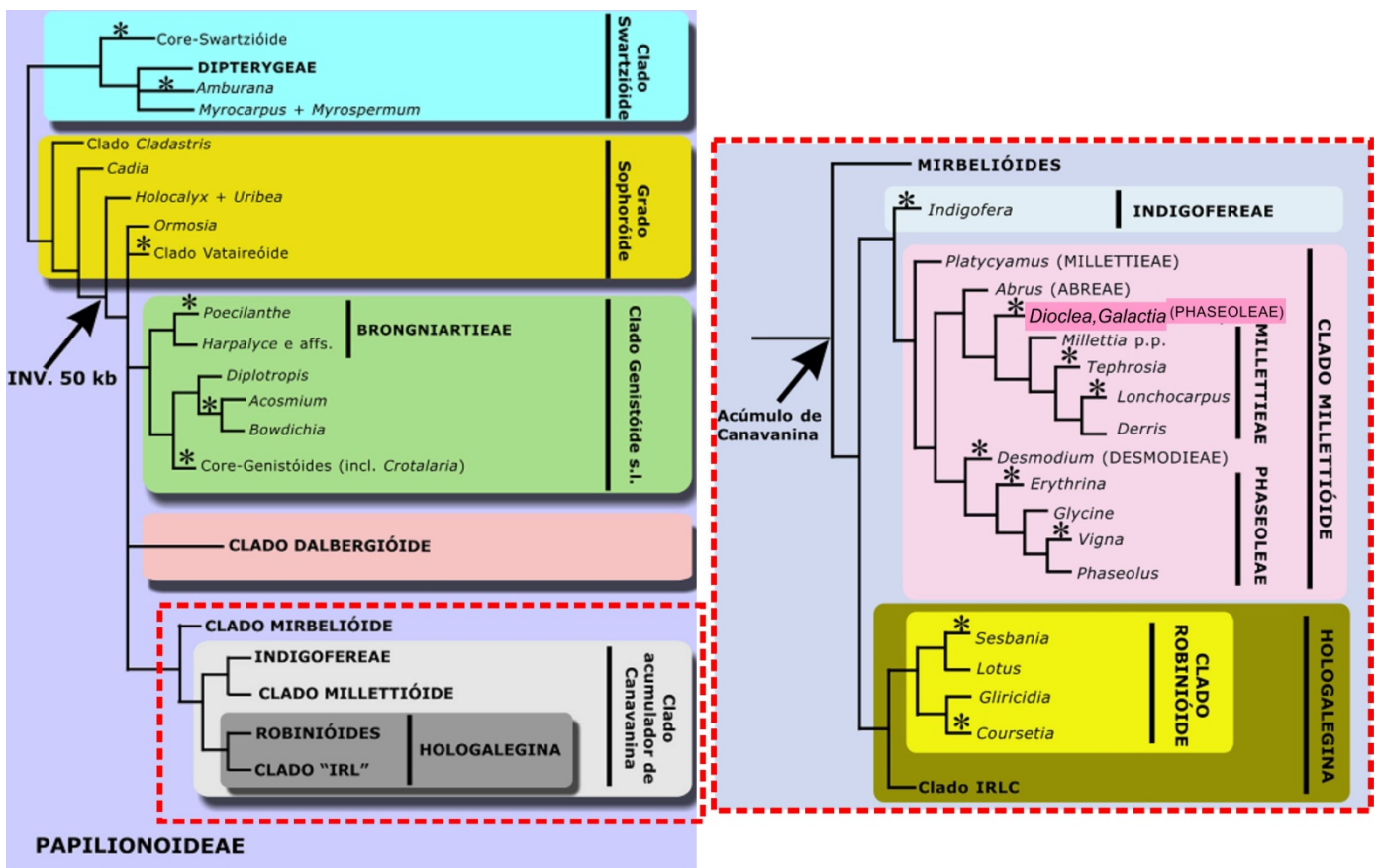


Figura 1. Clado Millettióide ou Millettióide-Phaseolóide (Queiroz 2009)

O gênero *Dioclea* é formado por aproximadamente 40 espécies distribuídas principalmente no neotrópico (Lackey 1981; Schrire *et al.* 2005) subordinadas tradicionalmente em quatro seções: *Platylobium*, *Macrocarpon*, *Pachylobium* e *Dioclea* (Maxwell 1969; Maxwell & Taylor 2003; Queiroz *et al.* 2003; Queiroz 2012). No Brasil ocorrem 32 espécies (Tabela 1) distribuídas nos domínios fitogeográficos Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal (Queiroz 2012).



Tabela 1. Seções e espécies de *Dioclea*. Distribuição do gênero no mundo (Schrire *et al.* 2005) e na flora brasileira (Queiroz 2012).

Seções	Espécies	Distribuição no Mundo
<i>Platylobium</i>	<i>Dioclea bicolor</i> Benth.	
	<i>Dioclea coriacea</i> Benth.	
	<i>Dioclea ferruginea</i> Ducke	
	<i>Dioclea scabra</i> (Rich.) R.H.Maxwell	
<i>Macrocarpon</i>	<i>Dioclea erecta</i> Hoehne	
	<i>Dioclea densiflora</i> Huber	
	<i>Dioclea huberi</i> Ducke	
	<i>Dioclea macrocarpa</i> Huber	
<i>Pachylobium</i>	<i>Dioclea edulis</i> Kuhlm.	
	<i>Dioclea flexuosa</i> Ducke	
	<i>Dioclea glabra</i> Benth.	
	<i>Dioclea grandiflora</i> Mart. exBenth.	
	<i>Dioclea grandistipula</i> L.P.Queiroz	
	<i>Dioclea latifolia</i> Benth.	
	<i>Dioclea malacocarpa</i> Ducke	
	<i>Dioclea marginata</i> Benth.	
	<i>Dioclea megacarpa</i> Rolfe	
	<i>Dioclea mollicoma</i> Ducke	
	<i>Dioclea reflexa</i> Hook. f.	
	<i>Dioclea rufescens</i> Benth.	
	<i>Dioclea schottii</i> Benth.	
	<i>Dioclea sclerocarpa</i> Ducke	
<i>Dioclea ucayalina</i> Harms.		
<i>Dioclea violacea</i> Mart. ex Benth.		
<i>Dioclea wilsonii</i> Standl.		
<i>Dioclea</i>	<i>Dioclea apurensis</i> Kunth.	
	<i>Dioclea burkartii</i> R.H.Maxwell	
	<i>Dioclea fimbriata</i> Huber	
	<i>Dioclea guianensis</i> Benth.	
	<i>Dioclea lasiophylla</i> Mart. ex Benth.	
	<i>Dioclea macrantha</i> Huber	
	<i>Dioclea virgata</i> (Rich.) Amshoff	

O gênero *Dioclea* é polifilético (Schrire *et al.* 2005) e essa condição é confirmada tanto nas análises filogenéticas morfológicas (Queiroz *et al.* 2003; Maxwell & Taylor 2003) quanto moleculares (Varela *et al.* 2004). As espécies estão distribuídas em dois clados (Fig. 1), um constituído por espécies das seções *Platylobium*, *Macrocarpon* e *Pachylobium* e denominado clado Pachylobium e outro integrado por espécies da seção *Dioclea* denominado clado Dioclea (Queiroz *et al.* 2003). A espécie *Dioclea paniculata* (seção *Macrocarpon*) aparece na hipótese de Queiroz *et*

al. 2003 como irmã das espécies remanescentes que incluem o clado Dioclea. Cada clado é definido por um conjunto de sinapomorfias assim, o clado *Pachylobium* é caracterizado por apresentar inflorescências com braquiblastos secundifloros, cálice com curvatura dorsal com lobos mais longos que o seu tubo, estilo geniculado expandido próximo à região mediana e alas amplamente obovadas. O clado *Dioclea* é caracterizado por apresentar inflorescências com braquiblastos finos à ramificados e pedunculados, com margem superior da quilha dentada a fimbriada e frutos com uma ala estreita paralela a sutura (Queiroz *et al.* 2003).

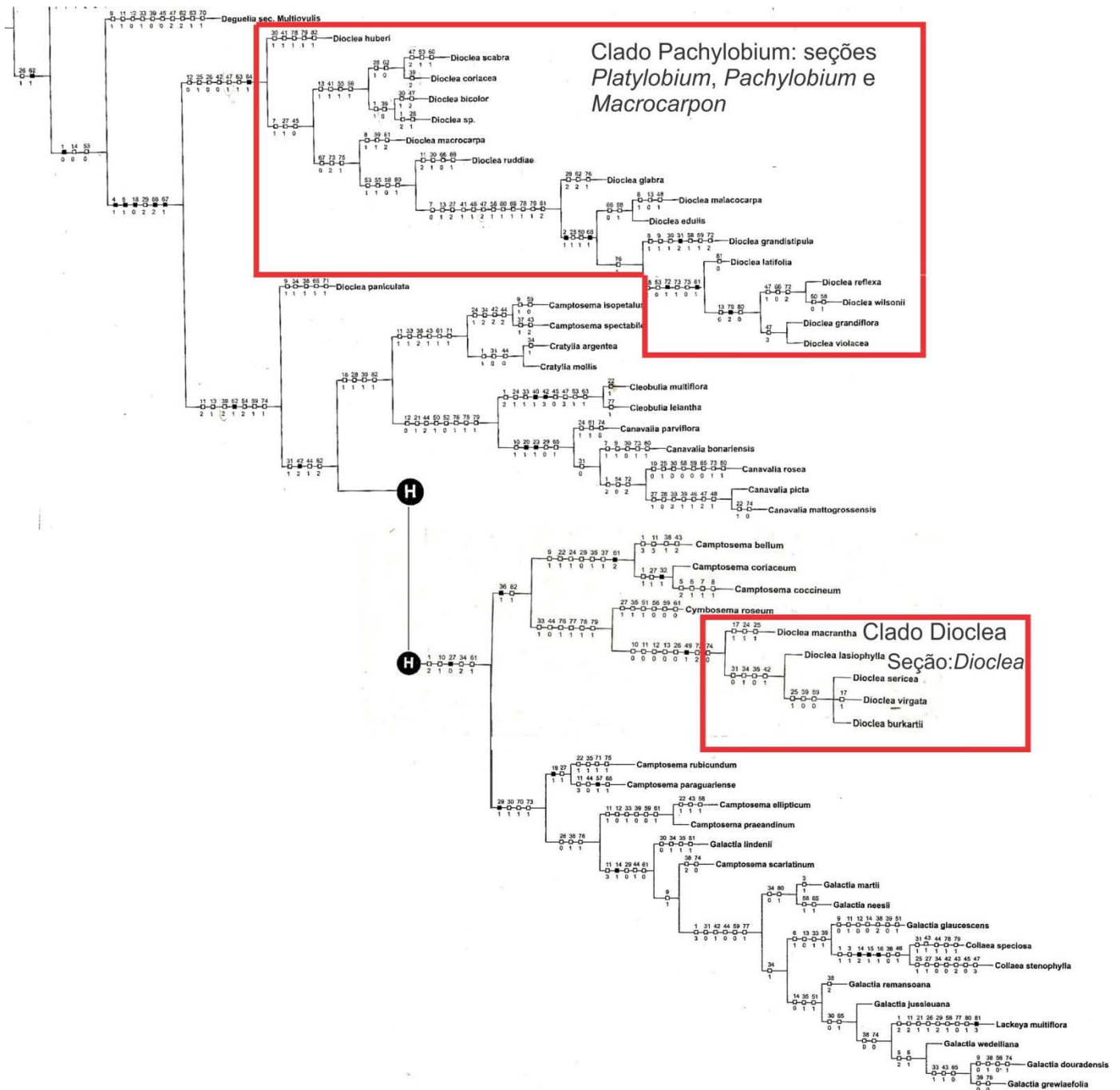


Figura 2. Filogenia morfológica de espécies de *Dioclea* proposta por Queiroz *et al.* 2003

Uma das marcantes características na evolução das Leguminosae é a formação das flores papilionáceas na subfamília Papilionoideae (Leppik 1966), que constitui uma sinapomorfia na subfamília (Pennington *et al.* 2000) sendo encontrada no gênero *Dioclea*. As flores papilionáceas apresentam o tipo imbricado de prefloração que se caracteriza pela presença de pétalas abaxiais (quilha) internas as pétalas laterais (alas) e pétala adaxial em posição mediana (Queiroz 2009). Tal prefloração constituiu uma mudança no padrão de simetria da estrutura floral na família, de radial presente nas Mimosoideae para a simetria zigomorfa (dorsiventral) presente de maneira variável nas Caesalpinioideae a fortemente zigomorfa em muitas Papilionoideae (Leppik 1966; Arroyo 1981; Tucker 1997) e conferiu aos referidos grupos um alto nível evolutivo (Leppik 1966) por maximizar o transporte dos grãos de pólen entre parceiros de uma mesma espécie (Polhill *et al.* 1981).



Figura 3. Prefloração imbricada das flores papilionáceas em *Dioclea*. A. esquema da prefloração; B. *Dioclea marginata*, C. *Dioclea wilsonii*. Barra= 0,5cm

A organização peculiar apresentada pela flor papilionácea (Queiroz 2009) não configura uma exclusividade das Leguminosae - Papilionoideae e ocorre em diversos táxons, como em todas as espécies das famílias Fumariaceae, Trigonaceae, Polygalaceae, Acanthaceae e Strelitziaceae; nos gêneros *Delphinium* e *Consolida* em Ranunculaceae; *Collinsia* e *Calceolaria* em Scrophulariaceae; *Cercis* em Leguminosae - Caesalpinioideae; *Lopezia* em Onagraceae; *Schizanthus* em Solanaceae (Westerkamp 1997). As espécies *Pelargonium rapaceum* (Geraniaceae) e *Aneilema tanaense* (Commelinaceae) também possuem flores papilionáceas (Westerkamp 1997).

O termo “papilionácea” é ambíguo, pois é referido tanto para as flores pentâmeras zigomorfas quanto para a subfamília Papilionoideae, com isso, Faegri & van der Pijl (1979) propuseram o termo “flores estandarte” em referência a pétala estandarte, que é a maior entre as demais pétalas, está localizada na parte dorsal (superior) da flor e desempenha um papel atrativo para os

polinizadores. Entretanto a estrutura mais importante dessas flores é a quilha, pois desempenha papel fundamental na polinização. Desta forma, o termo mais adequado é “flores de quilha” (Westerkamp 1997).

As flores de quilha (Fig. 4D) são definidas por dois principais elementos funcionais: um estandarte expandido voltado para atração visual e pétalas inferiores que permanecem mais ou menos na posição de botão, formando um complexo constituído pela ala e quilha que encerra os órgãos reprodutivos (Westerkamp & Paul 1993). Compreendem um importante grupo de flores longo-tubuladas em que as sépalas estão unidas formando um tubo (Fig. 4E, seta branca), enquanto as pétalas envolvidas por esse tubo permanecem separadas. Essas flores são geralmente polinizadas por insetos, principalmente abelhas fortes e de língua longa (Fig. 4E) (Proctor *et al.* 1996). Elaboraões adicionais na forma floral geral, como graus variados de conação entre as alas e quilha (Endress 1994), bem como estruturas que surgem em estágios tardios do desenvolvimento ontogenético como esculturações na superfície adaxial das alas (Fig. 4F), aurículas e calosidades (Fig. 4G) (Tucker 1997) contribuem como ponto de apoio para os polinizadores (Stirton 1981) e para a ocultação tanto do néctar como dos órgãos de reprodução, revelando especializações relacionadas aos sistemas de polinização (Arroyo 1981; Tucker 1997).

Em *Dioclea* a organização morfológica é típica das “flores de quilha” (Arroyo 1981; Franco 1995), consistindo num estandarte de coloração lilás a roxa, exceto em *Dioclea grandistipula* L. P. Queiroz com estandarte branco (Queiroz 1998). A porção central do estandarte apresenta uma região amarela que corresponde ao guia de néctar, um pouco abaixo dessa são observadas duas calosidades e na porção basal duas aurículas (Fig. 4E). Além da pétala estandarte ocorrem outras quatro peças, duas laterais denominadas alas e duas fusionadas em ambas as margens que abrigam os órgãos reprodutivos, denominadas quilha (Queiroz 2009) (Fig. 4D).

A quilha nas flores papilionáceas pode apresentar modificações, como a fusão de ambas as margens produzindo diferenças no mecanismo de apresentação dos grãos de pólen aos polinizadores (Endress 1994). O mecanismo de polinização constitui uma das características importantes das flores de quilha (Arroyo 1981), tornando mais eficiente e econômica a deposição dos grãos de pólen tanto no corpo do polinizador quanto no estigma da flor (Cronk & Ojeda 2008). São descritos quatro tipos de mecanismos: valvular, pistão, escova e explosivo (Arroyo 1981; Schrire 1989; Endress 1994; Westerkamp 1997). Cada mecanismo para ser executado depende de certas características morfológicas florais. No mecanismo de pistão, por exemplo, as flores estão associadas com anteras dimórficas (Arroyo 1981; Schrire 1989) e ambas as margens da quilha são

fusionadas (Endress 1994) expondo o pólen apenas pelo topo da quilha. No mecanismo valvular a margem superior da quilha se abre ao longo do seu comprimento quando essa se move para baixo e os órgãos reprodutivos são expostos tão distante quanto a pressão mantida sobre a mesma (Westerkamp 1997). Dentre as subtribos de Phaseoleae são encontrados representantes de Phaseolinae cuja a quilha possui ambas as margens fusionadas. Tal característica constitui uma extrema adaptação da morfologia floral em direção à entomofilia (Lackey 1981), além de ser uma das características mais derivadas dentre as tendências evolutivas das Papilionoideae (Polhill 1981). Nas *Dioclea* (Diocleinae) a existência de quilha com fusão em ambas as margens (quilha rostrada) é encontrada apenas nas espécies das seções *Pachylobium* e *Platylobium* (Queiroz 2009).

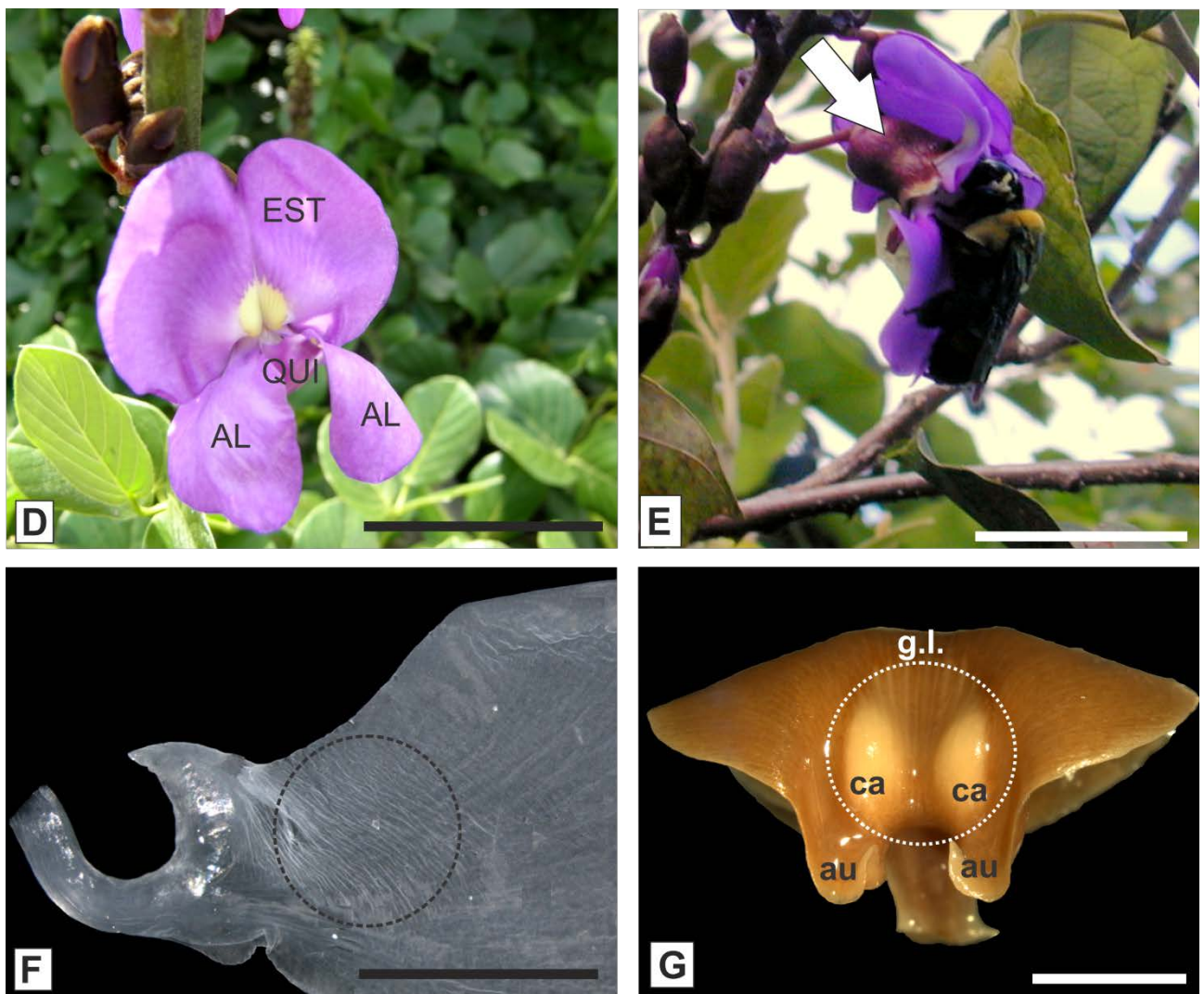


Figura 4. Flores do tipo quilha de espécies de *Dioclea* (seção *Pachylobium*). D. Aspecto geral da flor de *D. marginata* com guia de nectário amarelo no centro da pétala estandarte; E. Abelha *Centris (Ptilotopus) sponsa* Smith em visita a flor de *D. glabra*; F. Esculturação na ala de *D. grandiflora*; G. Pétala estandarte de *D. schottii*. **Seta branca:** cálice gamossépalo formando uma estrutura tubular; **Círculo tracejado preto:** área esculturada; **ca:** calosidade na região centro-basal do estandarte; **ES:** pétala estandarte; **AL:** pétala das alas; **QUI:** pétalas da quilha; **au:** aurículas na base da pétala; **g.l. e círculo pontilhado:** guia de língua. Barra=0,5 cm.

Na pétala estandarte o guia de néctar (Fig. 4D) é parte integrante de flores mais especializadas polinizadas por abelhas e representam áreas contrastantes no padrão UV indicando onde o néctar e as anteras estão ocultos (Endress 1994). Na região do guia de néctar existe uma estrutura que constitui um tipo de recurso táctil modificando a textura da superfície da pétala (Fig. 4D e 4G) e permitindo o seu reconhecimento por parte das abelhas à procura do néctar (Endress 1994), tal estrutura corresponde ao guia de língua (Fig. 4G, círculo pontilhado branco) conferindo ao estandarte essa função adicional, bastante negligenciada nos estudos (Westerkamp & Weber 1999).

O guia de língua compreende um canal delimitado por um par de protuberâncias e constitui uma estrutura relacionada à proteção da estrutura floral tanto na polinização por insetos quanto por aves (Cronk & Ojeda 2008). O canal guia o aparelho bucal do polinizador em direção ao nectário e ajusta a abelha na flor (Westerkamp & Weber 1999), impedindo de forma efetiva o acesso lateral ao néctar por polinizadores ilegítimos (Polhill 1976). As protuberâncias agem adicionalmente como uma alavanca que permite ao polinizador levantar a pétala estandarte e alcançar o néctar; Estão posicionadas próximo ou no ponto de junção das pétalas, resultando numa estrutura muito rígida que exige um esforço considerável por parte dos insetos para acessar o recurso (Fig. 4D, 4E e 4G). Tal estrutura, está associada a flores com estandarte bastante reflexo, quilha rostrada e aos mecanismos de polinização do tipo pistão e escova (Le Roux & Van Wyk 2012). Em *Vigna caracalla* (L.) Verdc. (Fabaceae - Phaseolinae) o guia de língua é descrito como duas cristas proeminentes situadas na base da pétala estandarte, na região amarela correspondente ao guia de néctar, bloqueando o acesso ao néctar pelas laterais (Etcheverry *et al.* 2008). Em Crotalarieae (Fabaceae - Papilionoideae) foram descritos por Le Roux & Van Wyk (2012) outras formas de guia mecânico de língua: em disco e crista, nos gêneros *Aspalathus* e *Rafnia*; em crista e não pareado, em *Bolusia*; em disco e crista na maioria das *Crotalaria*, além de outras formas como colunar (*Crotalaria flavicarinata* Baker f.) e lameliforme (*Crotalaria juncea* L.). Em Phaseolinae, considerado um dos grupos mais derivados das Phaseoleae (Lackey 1981), ocorre da mesma forma que em Crotalarieae variações na forma da calosidade, desde de uma única estrutura bilobada (*Dipogon*) a quatro estruturas longas e estreitas (*Macrotyloma*) (Lackey 1981).

O guia de língua na forma de uma protuberância na base do estandarte é observado nas tribos Crotalarieae, nos gêneros *Bolusia* e *Crotalaria* (Le Roux & Van Wyk 2012) e Phaseoleae, nas seguintes subtribos: Diocleinae (*Dioclea*, *Collaea speciosa*, *Canavalia rosea*, *C. picta*, *C. matogrossensis*, *Camptosema ellipticum*, *C. praeandinum*, *Galactia glaucescens*, *G. grewiaefolia*), Cajaninae (*Adenodolichos punctatus*, *Cajanuscajan*, *Eriosema psoraleoides*), Clitoriinae (*Periandra mediterranea*), Glycininae (*Pueraria lobata*) e Phaseolinae (*Vigna*, *Dipogon*,

*Spathionema*, *Dolichos* e *Macrotyloma*) (Lackey 1981; Queiroz 1999; Queiroz *et al.* 2003; Andrade 2008). Nas espécies de *Dioclea* a estrutura é referida em publicações taxonômicas como calosidade (Maxwell 1969; Queiroz *et al.* 1998) e sua ocorrência e aspecto varia entre os táxons. Nas espécies da seção *Pachylobium* a calosidade é caracterizada como fortemente desenvolvida, enquanto nas demais seções (*Dioclea*, *Platylobium* e *Macrocarpon*) varia entre fracamente desenvolvida (vestigial) a ausente (Maxwell 1969; Queiroz *et al.* 2003). Devido à diversidade na ocorrência e caracterização esse caráter foi utilizado por Maxwell (1969) na delimitação das seções do gênero *Dioclea* e constituiu um dos caracteres utilizados nos tratamentos filogenéticos morfológicos propostos por Queiroz *et al.* (2003) e Maxwell & Taylor (2003). Apesar do emprego desse caráter na sistemática do grupo, existem divergências entre os autores quanto à presença do calo e mesmo com relação à sua caracterização (desenvolvido e vestigial), pois somente o critério visual foi aplicado. Como exemplos da divergência na caracterização pode-se citar *Dioclea virgata* (Rich.) Amshoff, em que Queiroz *et al.* (2003) descrevem a estrutura como vestigial, enquanto Maxwell (1969) a caracteriza como vestigial ou bicalosa e *Dioclea guianensis* Benth. cuja calosidade foi descrita como ausente e presente pelo mesmo autor em diferentes trabalhos (Maxwell 1969; Maxwell 1980, respectivamente). Tais divergências na caracterização do calo provavelmente estão relacionadas à dificuldade na observação em pétalas longas e membranáceas, o que não ocorre em pétalas carnosas (Maxwell & Taylor 2003).

A referida condição polifilética indica que as categorias subgenéricas dentro dos clados de *Dioclea* ainda não estão bem resolvidas, tanto pelo reduzido número de espécies estudadas, como de caracteres relevantes (Maxwell & Taylor 2003). Assim, uma cuidadosa investigação morfológica é necessária, a exemplo do realizado por Prenner (2004) com as bractéolas muito utilizadas em análises filogenéticas morfológicas nas Leguminosae, nas espécies *Baptisia australis* R. Br., *Dorycnium germanicum* Rouy, *Ebenus cretica* L., *Laburnum alpinum* J. Presl., *Lathyrus latifolius* L. *Kennedia nigricans* Lindl., *Petteria ramentacea* (Sieber) Presl. *Thermopsis lanceolata* R. Br.

Pétalas com diferentes formas elaboradas, como as pétalas estandarte das flores papilionáceas, geralmente possuem estruturas especiais que adquiriram funções distintas em diferentes grupos de plantas, entretanto sua anatomia, função e diversidade são pouco exploradas (Endress & Matthews 2006). A maioria dos estudos recentes se detém à diferenciação da epiderme, que desempenha um reconhecido papel óptico de atração. Ojeda *et al.* (2009), por exemplo, descreveram células papilosas na superfície adaxial da pétala, que promoveram um aumento no brilho da flor e a atração de polinizadores. O trabalho de Whitney & Glover (2007) apresentou uma visão geral da morfologia e desenvolvimento de características nas pétalas envolvidas no reconhecimento das

flores pelos polinizadores. Vaes *et al.* (2006) descreveram a ontogenia e a anatomia de um apêndice na corola de seis espécies de *Spermacoce* (Rubiaceae) para testar a hipótese de homologia entre os diferentes tipos de pétalas elaboradas e seu papel na polinização.

Nas Papilionoideae as diferentes estruturas presentes nas pétalas das flores de quilha exercem funções diversas na polinização, como por exemplo: as diferentes formas de esculturação presentes das alas, que servem de apoio para as pernas das abelhas polinizadoras (Stirton 1981); protuberâncias ventrais (Endress 1994) e calosidades na base da pétala que reforçam a arquitetura floral (Endress & Matthews 2006). Foi reconhecida para as espécies de *Dioclea rufescens* e *Dioclea violacea* o uso da calosidade na base do estandarte como um guia de língua por abelhas grandes do gênero *Centris* e *Xylocopa* (Franco 1995). Esta calosidade proporciona o encaixe do aparelho bucal (glossa) dessas abelhas no canal estreito (área que corresponde a uma depressão formada entre as protuberâncias do calo) do tubo floral, além de garantir para uma das abelhas (*Centris*) maior estabilidade de pouso, pelo fato de tornar possível a fixação de suas mandíbulas na região do calo, causando danos apenas nessa região da pétala o que não ocorre com a abelha *Xylocopa* que devido ao fato de não utilizar as mandíbulas para se apoiar danifica toda a flor causando desse modo, um decréscimo na polinização (Franco 1995). Apesar desse fato são desconhecidos estudos sobre a anatomia dessa estrutura, sua contribuição para a formação dos diferentes níveis de abertura do tubo floral, bem como a ontogenia da calosidade e os processos que resultam na estrutura fortemente desenvolvida, vestigial ou ausente. Face ao exposto, o presente o estudo tem por objetivos descrever a anatomia da pétala estandarte de espécies de *Dioclea*, bem como a ontogênese da calosidade em cinco dessas espécies, de forma a responder as seguintes questões:

- 1- Como é a morfologia e anatomia da calosidade e como os diferentes tipos de calosidades se distribuem entre as seções de *Dioclea*?
- 2- Nas *Dioclea* ocorre a condição ausente/vestigial para o calo?
- 3- Como é o desenvolvimento do calo? Seu desenvolvimento corrobora a hipótese de Tucker (1997) que correlaciona a expressão tardia do desenvolvimento floral a caracteres mais especializados?
- 4- Existe correlação entre a ocorrência da calosidade e o modo como as abelhas manipulam as flores durante a polinização?



Artigo I

**The role of the callus on standard petal of *Dioclea* Kunth. (Leguminosae-Papilionoideae-Diocleinae): How petal anatomy can contribute to understand pollination and the group phylogeny?**

Artigo a ser submetido para publicação na Annals of Botany

## **The role of the callus on standard petal of *Dioclea* Kunth. (Leguminosae-Papilionoideae-Diocleinae): How petal anatomy can contribute to understand pollination and the group phylogeny?**

- *Background and Aims* The callus at the base of the standard petal is an important character for both the taxonomy and phylogeny, as well as to pollination biology. However the literature reports divergences in the classification and occurrence of the structure. The aims were to characterize the morphology and anatomy of the standard petal of *Dioclea* species, characterizing the callus and channel region to understand the occurrence of the callus in sections, and its relation with the approach behavior of bees on flower.
- *Methods* The petal anatomy and morphology were described using light and scanning electron microscopy, and its potential to separate the species and sections were tested.
- *Key results* The callus is conspicuous in *Pachylobium* section and *Platylobium* section species and inconspicuous in *Dioclea* section species. The features of the callus and channel allow the separation of the species in two groups, one consisting of species *Pachylobium* section characterized by the presence of epidermal cells elongated polygonal in the callus region, lacunar collenchyma on the callus abaxial mesophyll and five or more cells of layers of annular collenchyma on the callus adaxial mesophyll; species of sections *Platylobium* and *Dioclea* were grouped by the presence of polygonal epidermal cells in the callus, by the present of the annular collenchyma on the callus abaxial surface and less than five layers of collenchyma in the callus adaxial mesophyll.
- *Conclusions* The morphological and anatomical data confirms the existence of the callus in all analyzed species, and its aspect allows the separation of the species in the sections. This structure deserves attention in future phylogenetics analyses. The collenchyma composition of the callus allows the approach of strong bees that use the callus to attach. It is recommended callus anatomy studies covering *Macrocarpon* section species to understand how the callus structure evolve in *Dioclea*.

**Key words:** Leguminosae, genus *Dioclea*, callus, standard petal, anatomy, collenchyma, cluster analysis, pollination.

## Introduction

In Leguminosae the "keel flowers" (Westerkamp, 1997) of Papilionoideae are defined by two main functional elements: a petal standard expanded to visual attraction and lower petals that remain similar to the bud position, forming a complex consisting of the wing and the keel enclosing the reproductive organs (Westerkamp and Paul, 1993). These flowers exhibit petals with elaborate structures that exert different functions in pollination, such as: different forms of sculpturing present on the wings, which serve as support for the legs of bees pollinating (Stirton, 1981), ventral protrusions (Endress, 1994) and callosities at the base of the petal that reinforce the floral architecture (Endress and Matthews, 2006).

Callosities with different forms have been described in petals of Crotalarieae (Leguminosae-Papilionoideae) by Le Roux and Van Wyk (2012), in the genera *Aspalathus* and *Rafnia* (disc and ridge), *Bolusia* (disc and unpaired) and *Crotalaria* (disc, ridge, column and lamelliform). In Phaseolinae considered one of the groups derived from Phaseoleae (Lackey, 1981) occurs a variation in the callus shape from a single bilobed in *Dipogon* to four long and narrow structures in *Macrotyloma* (Lackey, 1981). Diocleinae (Phaseoleae) the callus are observed in different taxa, among them *Dioclea* and until now the information available in the literature have not registered morphological variation of callus in the taxa of the subtribe (Lackey, 1981; Queiroz, 1999, Queiroz *et al.*, 2003; Andrade, 2008).

*Dioclea* consists of about 40 species distributed mainly in the Neotropics (Lackey, 1981, Schrire *et al.*, 2005) traditionally subordinated into four sections: *Platylobium*, *Macrocarpon*, *Pachylobium* and *Dioclea* (Maxwell, 1969; Maxwell and Taylor, 2003; Queiroz *et al.*, 2003; Queiroz, 2012). In Brazil there are 32 species belonging to different phytogeographic domains (Queiroz, 2012). The genus forms a polyphyletic group (Schrire *et al.*, 2005) and this condition is confirmed both in morphological (Queiroz *et al.*, 2003; Maxwell and Taylor, 2003) and molecular (Varela *et al.*, 2004) phylogenetic analyzes.

The species of *Dioclea* are lianas to shrubs with stipules peltate or not, leaves are pinnately trifoliolate, with stipules, the inflorescences are racemes pseudo-woody, nodose (Queiroz *et al.*, 2004). The organization of floral morphology in *Dioclea* is typical of the keel flowers (Arroyo, 1981; Franco, 1995). The standard petal in flowers displays lilac to purple coloration, except in *Dioclea grandistipula* L.P. Queiroz which is white (Queiroz, 1998). In its basal region there is a nectar guide of yellow color (nectar guide), which is characteristic of flowers pollinated by bees (Endress, 1994). In the complex wing-keel, the keel can or can't display fusion of both margins forming a rostrum with variable aspect (Queiroz, 2009).

The callus on *Dioclea* flowers is located at the base of the standard petal and its occurrence and appearance varies among taxa (Maxwell, 1969; Queiroz *et al.*, 1998). In species of the section *Pachylobium* the callus was characterized by Maxwell, 1969 as a strongly bicallose protusion, while in the other sections (*Dioclea*, *Platylobium* and *Macrocarpon*) its occurrence is weakly bicallose (vestigial) to absent. Due to its variability this character was used by Maxwell (1969) in delimiting the sections within *Dioclea*. It was one of the characters used in morphological phylogenetic treatments proposed by Queiroz *et al.* (2003) and Maxwell and Taylor (2003). Despite the relevance of this character in the systematics of the group, there are divergences among authors concerning the occurrence and characterization (strongly bicallose and vestigial) of the callus, because only the visual criterion was applied. An example of the divergence in the characterization of the callus is found in *Dioclea virgata* (Rich.) Amshoff and *Dioclea guianensis* Benth. Queiroz *et al.* (2003) described the callus in the first one as vestigial and Maxwell (1969) as vestigial or bicallose and in the *D. guianensis* Maxwell (1969) first described the absence of the structure and later report its presence (Maxwell, 1980).

The callus on standard petal of *Dioclea* species function as a tactile signal allowing the recognition by bees in search of nectar (Endress, 1994), as a tongue guide giving the standard this additional function, rather neglected in studies (Westerkamp and Weber, 1999) and block access to the nectar from the sides (Etcheverry *et al.*, 2008). Studies conducted in *Dioclea rufescens* and *Dioclea violacea* refers that the callus provide the fitting of the large mouthparts of bees of the genus *Centris* in the narrow central channel of the floral tube, and ensure a more stable landing, because it allows the bee to fix their mandibles in the region of the callus, causing damage only in this region of the petal which does not occur with *Xylocopa* bees because it does not use the mandibles to attach, and as a result it damage the flower as a whole, thereby causing a decrease in pollination (Franco, 1995).

This work intend to characterize the morphology and anatomy of the standard petal of *Dioclea* species, characterizing the callus and channel region and answer the following questions: 1- How is the distribution of the callus in sections of *Dioclea*? 2 - Is there any relation between the occurrence of the callus and the sections established? 3-Is there any relation between the anatomy of the callus and approach behavior of bees on flower of these plants?

## Materials and methods

### 1. Taxon sampling

Eleven species of *Dioclea* were selected from three sections of the genus according to previous description of the callus available in literature (Maxwell, 1969, Queiroz *et al.*, 2003, Maxwell and Taylor, 2003). The species list, previous callus description, sampling sites and voucher information were available in Table 1 and Fig 1.

### 2. Morphological study of flowers and petal standard

Images of flowers and petals of *D. bicolor*, *D. coriacea*, *D. glabra*, *D. grandiflora*, *D. sclerocarpa*, *D. schottii*, *D. virgata* and *D. wilsonii* were captured on camera model Leica DFC320 under stereomicroscope model Leica MZ16 and *D. lasiophylla*, *D. marginata* and *D. violacea* on camera Olympus model SC30 under stereomicroscope model Olympus SZ61. These records were used both for the study of morphological traits involved in the exposure of the reproductive organs as to characterize the appearance of callus on the flower and its longitudinal position on the petal.

### 3. Exposure of the reproductive organs of species *Dioclea*

Floral morphological traits involved in the exposure of reproductive organs and how such structures are presented to flower visitors were described as follows: the organization of anthers on the stamens (whether uniform or dimorphic), the shape of the keel (if rostrate or not), the type apex (acuminate, obtuse or truncated) and local exposure of the reproductive organs in the keel.

### 4. Anatomical study (light microscopy)

At least two fresh flowers in anthesis of each species were collected, fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.3 (Haddad *et al.*, 1998) and dehydrated in an ethanol series. The flowers were dissected to separate the standard petal. Fragments with the callus corresponding to the middle third of the blade and the median basal portion of the yellow central area of petal standard were subsequently infiltrated with 2-hydroxyethyl-methacrylate Leica Heidelberg Resin. After polymerization the samples were transversally cut in the average thickness of 1µm in Spencer rotary microtome Lens Co. using steel razor D for the manufacture of permanent slides and stained with toluidine blue (O'Brien and McCully, 1981) and subsequently the images were captured in light microscope Olympus BX-50, equipped with digital camera Olympus SC30. The following measurements were taken of each species (n = 10): thickness of the callus, width and depth of the channel as schematized in Figure 2.

The epidermis of the standard petals in the regions of the middle third and callus were dissociated by Jeffrey method (Johansen, 1940), stained in aqueous safranin (0.5%) and observed under a cover slip and slide.

## **5. Scanning electron microscopy**

Fragments of the middle third of the petal and the callus fixed according to the method described in item 4, was dehydrated in acetone series and critical point drying using liquid CO<sub>2</sub> with a Leica EM CPD 030. After this process the material was mounted on stubs using double sided adhesive carbon tape, gold-coated with a sputter coater EMITECH K550X and then observed under a scanning electron microscope Zeiss EVO 040 (Klitgaard, 1999; Tucker, 2003).

## **6. Terminologies**

### **6.1. Aspect of the callus**

This study proposed the term conspicuous to describe very distinct and remarkable callus and the term inconspicuous when the callus is poorly differentiated or discrete, as a replacement to the terms used in the taxonomic literature strongly bicallose or developed and vestigial, respectively. Such substitution is due to the fact that the terms developed and vestigial more appropriately refer to ontogenetic processes.

### **6.2. Epidermal cell**

The outer periclinal and anticlinal walls of epidermal cells in the region of the middle third of the petal and callus were classified according to the terminology used by Koch *et al.* 2009.

### **6.3. Longitudinal position of the callus**

It has established a parameter for describing the longitudinal position of the callus on the standard petal, based on the model grid marked methodologies of Stirton (1981) and Kawabata *et al.* (2011). The grid solid lines has equal distances of 10 mm and divide the longitudinal axis in three main points basal, distal and center and the dotted lines subdivided the main line into superior and inferior (Fig 3). This parameter can also contribute to the classification of the appearance of the callus as conspicuous and inconspicuous.

### **7. Statistical treatment conducted on morphological and anatomical traits**

From the results of morphological and anatomical analyzes of the callus, channel and standard petal (in the region of the middle third) were raised a matrix of characters to perform a cluster analysis. We used the statistical package R CORE TEAM, 2012 to evaluate how *Dioclea* species are grouped and which characters have greater weight for their grouping.

### **8. Observation of pollinators and their behavior approach on flower**

The observation of flower visitors was conducted in five species (being on a plant of each) belonging to *Pachylobium* section, namely: *D. glabra*, *D. grandiflora*, *D. marginata*, *D. schottii* and *D. wilsonii*. The observation period in *D. glabra*, *D. marginata* and *D. wilsonii* was performed between 6h00 and 16h00 for five days; *D. schottii* between 7h00 and 17h00 for seven days and *D. grandiflora* between 8h00 and 16h00 for two days. The behavior of visitors animals in flowers was recorded by direct visual observations with the naked eye and/or with aid of binoculars and photographs. It was recorded the type of visitor and how the animal handling the flower in search of nectar. Only visitors who can activate the mechanism of exposure of the reproductive organs and touch the stamens and stigma were considered pollinators (Franco 1995, Westerkamp 1997). When possible, insects were captured with deadly chambers and sent to specialists for identification.

## Results

### Exposure of the reproductive organs of *Dioclea* species

*Dioclea* species exhibit variations in organization of the stamen, in the way the margins from the keel are fused, the occurrence of the keel apex and shape of the apex (Table 2). The androecium is pseudomonadelphous (arranged in a tube with two openings on the base) in all species (Figs. 7, 11, 15, 18, 23, 27, 31). The stamens are dimorphic (larger stamens with fertile anthers, alternating with stamens with smaller anthers usually sterile) in all species (Figs. 7, 19, 23, 27, 31), except for *D. lasiophylla* and *D. virgata* which have stamens of the same length (Figs. 11, 15). The keel of the section *Pachylobium* species were fused on both sides (rostrate) and the reproductive organs were exposed through the apex (Figs. 18, 22, 26, 30). In species of the section *Platylobium* keel fusion also occurs on both sides, however on the adaxial margin this fusion is very fragile and easily broken by any pressure exerted. The species of the section *Dioclea* have fusion only in the abaxial margin of keel (not rostrate). In both sections the exposure of reproductive organs occurs along the adaxial margin (Figs. 6, 10, 14). The keel in the species of the section *Dioclea* did not show an apex individualized, however in the other sections the apex are variable in form from acuminate (Figs. 4, 16, 20) to truncated (Figs. 24, 28) (Table 2).

### Morphology of the standard petal

The standard petal is reflex in all species (with the middle portion of the blade folded toward the abaxial surface) (Fig. 32, 36, 44, 48, 49, 53, 57, 61, 65, 66) except in *D. lasiophylla* (Fig. 40), which is straight. The petals also exhibit variation in its consistency, being membranous in the species of the sections *Platylobium* and *Dioclea* (Figs. 32, 36, 40, 44) and fleshy in species in the section *Pachylobium* (Figs. 48, 53, 57, 61, 65, 66).

The callus is a hardened protuberance presented in pairs on the adaxial surface located in the center of the basal portion, which corresponds to the yellow nectar guide in all species (Fig. 32, 36, 40, 44, 48, 49, 53, 57, 61, 65, 66). The channel is part of the region of the callus constituting a depression or groove formed by distancing of protuberances. Variations to certain features of the callus (appearance, shape in front view, thickness and longitudinal positioning on the base of the petal) and of the channel (aperture angle, width and depth) occurred between species and are summarized in Table 3.

The appearance of the callus (Table 3) revealed itself conspicuous in all species (Figs. 32, 36, 48, 49, 53, 57, 61, 65, 66) except *D. lasiophylla* and *D. virgata* which have it inconspicuous (Figs. 40, 44). The callus are rounded in *D. lasiophylla* (Fig. 40) and *D. virgata* (Fig. 44), triangular in *D.*



*bicolor* (Fig. 32), *D. coriacea* (Fig. 36), *D. grandiflora* (Fig. 49) and *D. wilsonii* (Fig. 66) and rectangular in *D. glabra* (Fig. 48), *D. marginata* (Fig. 53), *D. schottii* (Fig. 57), *D. sclerocarpa* (Fig. 61) and *D. violacea* (Fig. 65). The mean values of the thickness measurements of the callus (Table 3) separated the species into two classes:  $1000 < \mu\text{m}$  in *D. bicolor*, *D. coriacea*, *D. lasiophylla*, *D. virgata* and *D. schottii* and  $> 1000\mu\text{m}$  in *D. glabra*, *D. grandiflora*, *D. marginata*, *D. sclerocarpa*, *D. violacea* and *D. wilsonii*. Regarding the longitudinal positioning of callus only two species showed callus in basal position, basal-inferior in *D. lasiophylla* and basal-superior in *D. virgata*. The remaining species present the callus located in the center-superior position, being center-inferior only in *D. bicolor* and *D. wilsonii*.

The channel in the species presented three opening angles (Table 3): acute (Figs. 33, 54, 62), obtuse with rounded base (Figs. 37, 41, 45, 58) and obtuse with flat base (Figs. 50, 68). The average channel width (Table 3) separated the species into three size ranges:  $< 500 \mu\text{m}$  in *D. bicolor*, *D. virgata* and *D. sclerocarpa*, between 500 and 1000  $\mu\text{m}$  in *D. lasiophylla*, *D. glabra* and *D. marginata* and  $> 1000 \mu\text{m}$  in *D. coriacea*, *D. grandiflora*, *D. schottii*, *D. violacea* and *D. wilsonii*. The average values for depth of the channel (Table 3) also separated the species into three size ranges:  $<500 \mu\text{m}$  in *D. lasiophylla*, *D. virgata* and *D. wilsonii*, between 500 and 1000  $\mu\text{m}$  in *D. bicolor*, *D. glabra*, *D. grandiflora*, *D. schottii*, *D. sclerocarpa* and *D. violacea* and  $> 1000 \mu\text{m}$  in *D. coriacea* and *D. marginata*.

### **Anatomical characterization of the standard petal**

The epidermis is pluriseriate in all species, except in *D. lasiophylla* and *D. virgata* (uniseriate) and the outer periclinal cell walls are straight and tabular cells shape on the callus region (Figs. 74, 85, 91, 97, 107, 113), whereas on the other regions of the petal they are convex (Figs. 71, 77, 79, 82, 88, 94, 102, 104, 110). The cuticular membrane is thicker in callus region when compared to ordinary epidermal cells of the petal, with striated ornamentation. Table 4 presents the variation of the shape of the anticlinal cell wall and arrangement of cuticular relief among the analysed species. The anticlinal cell walls of the tabular cells (callus region) are polygonal in *D. bicolor*, *D. lasiophylla* e *D. virgata* (Figs. 75, 80, 86) and polygonal elongated in the other species (Figs. 92, 98, 108, 111, 114). The anticlinal walls of the convex cells (other regions of the petal) are unequal U-undulating (Figs. 72, 83, 89, 95, 105) except in *D. wilsonii*, which are straight (Fig. 111).

The convex epidermal cells can be characterized into three subtypes according to the contour of the outer periclinal walls and the aspect ratio (width by the height) of the cell. They are of cupola-shaped in *D. bicolor* (Fig. 71) and *D. coriacea* (Fig. 77); papilla cells in *D. marginata* (Fig. 88), *D.*

*schottii* (Fig. 102), *D. wilsonii* (Fig. 110), conical funnel-shaped contour (Fig. 82 black arrow) in *D. virgata*. Some species have more than one cell type (cupola and papilla cell) as *D. lasiophylla* (Fig.79), *D. sclerocarpa* (Fig. 94) and *D. violacea* (Fig. 104).

The cuticular relief of the convex cells has different sculpturing in different regions of a single cell in all species. The central field showed striations with reticulum arrangement in *D. bicolor*, *D. coriacea* (Figs.73, 78) and striations with edges arrangement in *D. marginata*, *D. schottii*, *D. violacea* (Figs. 90, 103, 106). It was also found a cuticular relief without any defined arrangement in *D. lasiophylla* e *D. virgata* (Fig. 81, 84), or striations are spread all over central field area without forming an elevation as observed in *D. sclerocarpa* e *D. wilsonii* (Figs. 96, 112). The cuticular relief in the anticline field have striations that radiate from the central field that can be: long (reached the limits of the anticlinal cell wall) and linear, distributed above a smooth cuticular relief in *D. bicolor*, *D. coriacea* (Figs. 73, 78) and above concentric striations in *D. marginata*, *D. sclerocarpa*, *D. grandiflora* (Figs. 90, 96, 101). The other species presented short and curved striations distributed above a smooth cuticular relief in *D. lasiophylla*, *D. virgata* (Fig. 81, 84) or striations dispersed over the whole anticline field area in *D. schottii*, *D. violacea*, *D. wilsonii* (Figs. 103, 106, 112).

The cuticular relief of the tabular cells has different sculpturing in the flat outer periclinal cell walls. The cells presented striations curved and irregular as observed in species *D. bicolor*, *D. marginata*, *D. wilsonii* (Figs. 76, 93, 115) and parallel striations in the other species (Figs. 87, 99, 109).

The mesophyll region of callus and channel showed histological different constitution (Figs. 33, 37, 41, 45, 50, 54, 58, 62, 67), when compared with the region of the middle third of the petal (Figs. 61, 67, 73, 79, 85, 91). While the mesophyll of the middle third petal is composed of spongy parenchyma in all species, the callus region is composed of collenchyma and fundamental parenchyma (Table 5).

Annular collenchyma integrates adaxial portion of mesophyll callus of all species and abaxial portion of mesophyll of *D. bicolor* (Fig. 34), *D. coriacea* (Fig. 38), *D. lasiophylla* (Fig. 42) and *D. virgata* (Fig. 46). The remaining species have lacunar collenchyma in the abaxial mesophyll (Figs. 52, 55, 60, 64, 68). The number of layers in the adaxial collenchyma was less than five in the species *D. bicolor*, *D. coriacea*, *D. lasiophylla* and *D. virgata* and greater than or equal to five in the other species. In the abaxial surface was observed a minor amount of collenchyma layers (less than five) in all species, except *D. sclerocarpa* (Fig. 62) and *D. violacea* (Fig. 66). Immediately below the layers of collenchyma occur parenchyma with large intercellular spaces in *D. bicolor* (Fig. 34) and *D. coriacea* (Fig. 38). In the channel the adaxial mesophyll in all species is formed by

annular collenchyma. *D. bicolor* (Fig. 35) and *D. lasiophylla* (Fig. 43) also present the same type of collenchyma on the abaxial surface. Lacunar collenchyma integrates abaxial mesophyll in the other species analyzed. The number of layers in the adaxial collenchyma was lower than five in *D. bicolor*, *D. coriacea*, *D. lasiophylla*, *D. virgata*, *D. marginata*, *D. schottii* and *D. wilsonii*, and greater than or equal to the five in the remaining species. In the abaxial face the amount of collenchyma layers was less than five in *D. bicolor*, *D. coriacea*, *D. lasiophylla*, *D. virgata*, *D. schottii* and *D. wilsonii* and greater than or equal to five in the other species. Typical fundamental parenchyma was observed under the collenchyma on both surfaces in all species (Figs. 35, 39, 43, 47, 52, 56, 60, 64, 70).

The vascular bundles are collateral in all species (Figs. 43, 52, 56, 64, 70, arrows).

The cluster analysis (Fig. 116) generated two major groups of species, the first meeting the species *Pachylobium* section and the second species of the sections *Platylobium* and *Dioclea*.

The combined characters of the epidermis and mesophyll grouped species of *Pachylobium* section by the presence of epidermal cells elongated polygonal in the callus region, lacunar collenchyma on the abaxial mesophyll callus and the number greater than or equal to five of layers of annular collenchyma on the adaxial mesophyll callus; Species of sections *Platylobium* and *Dioclea* grouped by the presence of polygonal epidermal cells in the callus, by the present of the annular collenchyma on the abaxial surface callus and fewer than five layers of collenchyma in the adaxial mesophyll callus. The characters of the epidermis, callus morphology, morphology and anatomy of the channel positioned *D. wilsonii* a group isolated from *D. grandiflora*, *D. marginata*, *D. sclerocarpa*, *D. glabra*, *D. schottii* and *D. violacea*. *D. wilsonii* presents epidermal cells in the middle third of the petal with straight anticlinal walls and irregular striations in cuticular relief of the center field dispersed without forming elevation, the callus in front view is triangular, with thickness greater than 1000µm, longitudinally located in the inferior center position. The opening of the channel forms an obtuse angle with rounded base, with depth less than 500 µm and with number less than five layers of abaxial collenchyma. The grouping formed by the aforementioned species share the presence in the epidermal cells of the middle third petal of the U-undulating anticlinal walls, of cuticular striations parallel in epidermal cell of the callus and reveal rectangular callus in front view, with superior center longitudinal positioning (Fig. 116, tables 4, 5, 6).

The species of the sections *Platylobium* and *Dioclea* formed two groups, the first consisting of *D. lasiophylla* and *D. virgata* who share the presence epidermal cells of the petal with irregular striations in center field concentrated forming a elevation and short curved striae on the anticline field over a smooth cuticular relief and also the rounded shape of the callus in front view, the depth

of channel less than 500µm and parenchymal cells without intercellular spaces. The second group of *D. bicolor* and *D. coriacea* species present in the center field cells with striations in cuticular relief arranged in reticulum and long and linear striations in the field anticline distributed over a smooth cuticular relief and have the triangular shape of the callus in front view and parenchyma cells showing large intercellular spaces (Fig. 116, table 4, 5, 6).

### **Pollinators and way of handling the flowers of species of *Dioclea***

The only visitors observed in flowers of species *Dioclea* analyzed were individuals Centridini female bees (Apidae) of species *Centris (Ptilotopus) sponsa* (Smith.) (Fig.117 A) and Xylocopini the genus *Xylocopa* (Fig.117 C) seeking nectar. The species *D. marginata* (Fig. 117 I, K) and *D. schottii* (Fig. 117 O) were visited from both bee species, however *D. glabra* (Fig. 117 F), *D. grandiflora* and *D. wilsonii* have received visits only bee *Centris (Ptilotopus) sponsa*. The behavior of the bee *Centris (Ptilotopus) sponsa* was similar in flowers species *Dioclea* visits, ie, the bee enters the flower and set their jaws on of the standard callous region (Fig. 117 F), causing damage only in this region (Fig. 117 G, H, L, M, N light arrows). The bee remains in a straight position (Fig. 117 F) and stop at that moment introduces their mouthparts through the channel formed by the protuberances of the callus to reach the nectar. The nectar in the flowers of *Dioclea* is stored in the compartment at the base of the tube formed by the fusion of fillets and access occurs through the fenestrate area (region with two openings) compartment (Fig. 117 E, gray arrow). Regarding *Xylocopa* bee enters the flower fixing all the legs on the wings and standard. As the bee moves enough to remain supported in floral structures, damages were found on the same site of contact with the legs of the bee (Fig. 117 J). In its motion to support themselves and put themselves in the best position to remove the nectar was observed that the mouthparts (Galea) bee (Fig. 117 dark circle) does not fit the channel formed by the callused area standard, unlike the bee *Centris (Ptilotopus) sponsa* (Fig.117B dark circle), thus the head of the bee *Xylocopa* remains some distance from the callused area impeding the use of jaws for the attachment this area (Fig. 117 I dashed circle).

## Discussion and conclusions

The structure of the callus on the petal is mentioned in many studies as a protuberance, ridge or appendage (Maxwell 1969, Lackey 1981, Schrire 1989, Endress 1994, Franco 1995, Westerkamp 1997, Queiroz *et al.* 2003, Etcheverry 2008, Le Roux & Van Wyk 2012) and only a few studies show classifications in morphology, revealing variations (Lackey 1981, Le Roux & Van Wyk 2012). The function assigned to callus structure corresponds to reinforcement of floral architecture (Endress 1994, Endress & Matthews 2006). In *Dioclea* the callus is a hard protuberance paired arranged in the adaxial petal blade, similar to that described for certain Phaseoleae (Lackey 1981) and in accordance with the morphotypes of the tribe Crotalarieae can be classified as ridge paired (Le Roux & Van Wyk 2012). Differently from Crotalarieae the callus in the *Dioclea* species present only one morphotype (two prominent ridges), agreeing with the classification of Etcheverry *et al.*, 2008. Nevertheless, morphological variations were found in general appearance (conspicuous and inconspicuous) as in front view (rounded, triangular and rectangular) and longitudinal positioning at the base of the petal (basal superior or inferior, center superior or inferior). Changes also occurred in the characters of the canal (opening angle, width and depth) that is part of the callus structure, however as it is related to the function of language guide bees is mentioned only in studies of reproductive biology (Franco 1995, Westerkamp and Weber 1999, Etcheverry *et al.* 2008) and even these works do not mentioned aspects of their morphology, treated in this study.

Callus morphology features associated with the channel allowed establishing two basic classifications (inconspicuous and conspicuous). The inconspicuous is characterized by the rounded shape of the callus in front view, the basal position (inferior or superior) and the opening angle of the channel (obtuse rounded base), this callus type has been found in *D. lasiophylla* e *D. virgata* (*Dioclea* section). The conspicuous is characterized by the rectangular and triangular shapes, the center position (inferior or superior) and the two opening angles of the channel: acute and obtuse (with flat and rounded base), found in *D. bicolor*, *D. coriacea* (*Platylobium* section), *D. glabra*, *D. grandiflora*, *D. marginata*, *D. schottii*, *D. sclerocarpa*, *D. violacea* e *D. wilsonii* (*Pachylobium* section).

The morphological results partly confirm the taxonomic characterization of the callus proposed by Maxwell (1969) and Queiroz *et al.* (2003), these authors describe the callus of the *Pachylobium* section species as strongly developed, i.e. conspicuous and in *Dioclea* and *Platylobium* sections weakly developed (vestigial) or absent, i.e., inconspicuous. In the present study the species of *Platylobium* and *Pachylobium* sections show a conspicuous callus, while the species of the section *Dioclea* presented it inconspicuous. The data obtained, also allow the rejection of the condition absence of callus described in the literature for the species *D. lasiophylla*, *D. bicolor* and *D.*

*coriacea*. The anatomical and morphological data showed the presence of these structures, which is difficult to visualize due to the consistency membranous of the petals (Maxwell & Taylor 2003).

In cluster analysis the morphology of the callus and the channel associated with anatomical characters were important to separate the species and the sections. In section *Pachylobium*, *D. wilsonii* (Fig. 116) characterized and separated from other species, mostly by morphology (shape, thickness and position of callus and aperture angle and depth of the channel). The cluster formed by the species *D. marginata*, *D. schottii*, *D. grandiflora*, *D. violacea*, *D. glabra* e *D. sclerocarpa* (Fig. 116) is mainly characterized by morphology (shape and position of the callus) when compared with the anatomical characters. In section *Platylobium* (Fig. 116) species *D. bicolor* and *D. coriacea* were characterized mainly by the shape in front view and organization of the parenchyma callus and in section *Dioclea* (Fig. 116) the species were also characterized by the shape in front view, organization of the parenchyma of the callus and the channel depth.

The region callous at the base of the standard petal of the species has a hard consistency, which recognizably works on strengthening the architecture of the petal (Endress 1994, Endress & Matthews 2006), unlike what is observed in the rest of the blade that is the attractive portion of the petal (Arroyo 1981, Endress 1994, Westerkamp & Weber 1999). The anatomy of the callus when compared with the middle third of the petal revealed a different histological composition, forming a specialized portion of the standard petal, which corresponds to the characteristics described by Endress (1994) for specialized structures with protective function.

The standard petal epidermis of the callus and the region of the middle third showed distinct cells, this difference in epidermal cell in different regions of a petal is a feature that occurs in the family Leguminosae exclusively in the Papilionoideae and has an adaptive value (Ojeda *et al.* 2009). Anatomical variations in the cells of the species studied occurred in the form (with respect to external periclinal wall and the anticlinal walls) and cuticular relief, representing two of the three levels sculpturing proposed by Barthlott (1990) which confer cells tactile and optical properties (Kevan & Lane 1985, Whitney *et al.* 2009) and may suggest the adaptive value of morphological (Ojeda *et al.* 2009) with the different functions performed by different regions of the petal (Endress 1994, Endress & Matthews 2006, Arroyo 1981, Westerkamp & Weber 1999).

The cuticular relief both in tabular as convex cells showed distinct ornamentation pattern within the striated, with greater variation in convex cells because they present different regions (central and anticlinal field). However, it can be seen that the variations in the striae convex cell comprise two situations: cells with the highest density of striae and cells with less density striae. The tabular cells showed curved irregular and parallel striae. The sculpture's surface produced by both the cell shape as by the cuticular relief produces different effects on the surface texture of petal (Koch *et al.*

2009, Kevan & Lane 1985) interfering in the tactile perception of pollinator (Kevan & Lane 1985), so the change in the pattern both in cell shape and in the cuticular relief of the callus and the middle third of the petal allows to suppose the function of tactile guide to the callous structure mentioned in the literature (Endress 1994, Schrire 1989).

The presence of collenchyma on both sides of the mesophyll callus region in the species analyzed adds strong evidence to the strengthening of floral architecture as reported by Endress (1994) and Endress & Matthews (2006). Collenchyma and sclerenchyma are the main tissues found in structures and elements of the perianth involved in protection function (Endress 1994) of flowers pollinated by big bees and hummingbirds (Cronk 2008).

The collenchyma is a mechanical tissue composed of elongated cells with thick primary walls non-lignified (Evert 2006, Fahn 1990, Beck 2005, Leroux 2012) and is present in herbaceous stems, leaves (Leroux 2012), fruit and floral parts (Fahn 1990) as in the petals (Endress 1994, Weberling 1989, Cronk 2008). The chemical composition of the cell wall in the collenchyma is similar to what occurs in the primary walls consisting of cellulose microfibrils embedded in a matrix consisting of complex polysaccharides classified as hemicelluloses and pectins (Evert 2006, Leroux 2012) that contribute to the biomechanical properties of the tension and flexibility of the collenchyma. The flexibility in turn, is an important property because it reduces the risk of rupture offering an advantage to plant parts subject to mechanical stress capable of damaging their tissues (Leroux 2012).

The presence of larger amounts of collenchyma layers adaxial surface appears to prevent permanent mechanical injury produced by the approaching of the pollinator in species *Dioclea*. Franco (1995) detailed the pollination biology of the species *D. rufescens* Benth. and *D. violacea*. The author report that strong bees with long tongues of *Centris*, Fabricius and *Xylocopa* Latreille are the main pollinators of these species because they can operate the complex pollination mechanism of these flowers. However, in comparison with *Centris*, *Xylocopa* causes a decrease in pollination because it causes damage to floral structure, *Centris* uses the callous area to fix its jaws increasing their equilibrium in flowers (Franco 1995). The same form of approach in the flowers by bees of the genera *Centris* and *Xylocopa* was detected in *D. glabra* and *D. marginata* (AF Peçanha, JBRJ, Rio de Janeiro, Brazil, data unpublished.). The record of the damage caused in the callus region by *Centris* allowed to understand the role of collenchyma in the adaxial mesophyll in maintaining the integrity of the callus structure and consequently its role in blocking the access side of the nectar by illegitimate visitors (Polhill 1976, Etcheverry *et al.*2008).

Le Roux and Van Wyk (2012) raised a correlation between the exposure mechanism of the pollen grains and the presence of callus in standard petal and suggested that in Crotalariaeae species

with piston mechanism show a strong callus that allows the pollinator to push the wing-keel down. The force to operate the mechanism of papilionoid flowers was measured in several families such as Lamiaceae, Polygalaceae, Plantaginaceae, Solanaceae, Orchidaceae and Cornaceae (Córdoba & Cocucci 2011) and more recently in the Leguminosae that showed high levels compared to other families, especially in the more derived flowers that present interconnection between wing and keel (Córdoba & Cocucci 2011). With the aim to prove such correlation the type of exposure of pollen grains was described for the species in this study (Table 2, Figs. 4-31). Section *Pachylobium* species exhibited a keel rostrate with narrow apex (acuminate and truncated), dimorphic anthers, the form of exposure of pollen grains occurs at the apex of the keel and wing and keel are interconnected by means of auricles (Franco 1995). In species of the section *Platylobium* despite of the rostrate keel (Queiroz *et al.* 2003, Maxwell & Taylor 2003) the fusion on the adaxial surface is very tenuous releasing reproductive organs along the adaxial margin as occurs in species of *Dioclea* section, whose keel is not rostrate. The anthers in *Platylobium* species are dimorphic, and wing and keel are free in *Dioclea* section and weakly interconnected in *Platylobium* section. In this way one can deduce that considerable force is applied for the bee to operate flowers of the species of *Pachylobium* section which respond to this demand with the formation of a larger number of layers collenchyma annular on the adaxial surface callus.

It is concluded from the data obtained that all *Dioclea* species have callus, supported by anatomical and morphological evidence. This structure allows the performance of strong bees with long tongue, which use the callus area to handle the flower. Variations in morphology and anatomy of the callus in the analyzed species allow the separation of the sections and species in the sections traditionally proposed by Maxwell (1969). However, the sections can now be defined not only by the presence of the callus, but also by their structure. Considering the potential of the structure in future combined phylogenetic studies, more species need to be investigated especially *Macrocarpon* section species to allow the establishment of a general classification for the genus, which is necessary to understand how the callus structure evolve in *Dioclea*.



Table 1. *Dioclea* species selected for study

Sections	Species				
	Classification of callus (according to the Maxwell 1969)			Samples of the present study	
	Strongly bicallose	Vestigial	Absent	Voucher	Collection Sites
<b><i>Pachylobium</i></b>	<i>Dioclea glabra</i>			RB498455	Distrito Federal, Brasília
	<i>D. grandiflora</i>			RB501973	Bahia, road Itatim-Sta. Terezinha (BA493), Km14
	<i>D. marginata</i>			HUEFS166672	Bahia, Ibiraba
	<i>D. schottii</i>			RB504786	Rio de Janeiro, Nova Friburgo, road Mury-Macaé de Cima, near Mirandela river
	<i>D. sclerocarpa</i>			RB511905	Pará, Parauapebas–Carajás, Carajás
	<i>D. violacea</i>			RB495052	Rio de Janeiro, Niterói, Mocanguê Grande Island
	<i>D. wilsonii</i>			RB507524	Rio de Janeiro, Silva Jardim, Reserva Biológica de Poço das Antas
<b><i>Dioclea</i></b>		<i>D. virgata</i>		RB512002	Pará, Parauapebas, Sossego Mine region
			<i>D. lasiophylla</i>	RB544867	Ceará, Parque Botânico de Caucaia
<b><i>Platylobium</i></b>		<i>D. bicolor</i>	<i>D. bicolor</i>	RB511906	Pará, Parauapebas, Carajás
		<i>D. coriacea</i>	<i>D. coriacea</i>	RB512000	Pará, Parauapebas, Carajás

Table 2. Floral characters related to the exposure of the reproductive organs in species of *Dioclea*

Sections	Species	Anther	Keel	Local exposure reproductive organ
			Fusion/Apex	
<i>Platylobium</i>	<i>D. bicolor</i>	Dimorphic	Rostrate/ acuminate	adaxial margin
	<i>D. coriacea</i>	Dimorphic	Rostrate/ acuminate	adaxial margin
<i>Dioclea</i>	<i>D. lasiophylla</i>	Uniform	Not rostrate/ absent	adaxial margin
	<i>D. virgata</i>	Uniform	Not rostrate/ absent	adaxial margin
<i>Pachylobium</i>	<i>D. glabra</i>	Dimorphic	Rostrate/ acuminate	Apex
	<i>D. grandiflora</i>	Dimorphic	Rostrate/ truncated	Apex
	<i>D. marginata</i>	Dimorphic	Rostrate/ truncated	Apex
	<i>D. schottii</i>	Dimorphic	Rostrate/ truncated	Apex
	<i>D. sclerocarpa</i>	Dimorphic	Rostrate/ acuminate	Apex
	<i>D. violacea</i>	Dimorphic	Rostrate/ truncated	Apex
	<i>D. wilsonii</i>	Dimorphic	Rostrate/ acuminate	Apex

Table 3. Summary of interspecific morphological variations.

Species	Callus				Channel			
	Aspect	Shape (front view)	Thickness $\bar{x}$ (mm)		Position (longitudinal)	Opening angle	Width $\bar{x}$ (mm)	Depth $\bar{x}$ (mm)
<i>D. bicolor</i>	conspicuous	triangular	613,4	677,8	center-inferior	acute	303	962,7
<i>D. coriacea</i>	conspicuous	triangular	575,9	747,3	center-superior	obtuse rounded base	1280,5	1466,6
<i>D. lasiophylla</i>	inconspicuous	rounded	922,7	975,6	basal-inferior	obtuse rounded base	768,5	342,7
<i>D. virgata</i>	inconspicuous	rounded	926,8	959,3	basal-superior	obtuse rounded base	327,1	150,7
<i>D. glabra</i>	conspicuous	rectangular	1372,6	1410,9	center-superior	acute	996	893,4
<i>D. grandiflora</i>	conspicuous	triangular	1181,5	1234,1	center-superior	obtuse flat base	1281,9	802,9
<i>D. marginata</i>	conspicuous	rectangular	1250,5	1352,3	center-superior	acute	543,2	1423,1
<i>D. schottii</i>	conspicuous	rectangular	919,8	939,2	center-superior	obtuse rounded base	1112,9	512
<i>D. sclerocarpa</i>	conspicuous	rectangular	1440,2	1461,2	center-superior	acute	263,6	538,9
<i>D. violacea</i>	conspicuous	rectangular	1514,1	1574,8	center-superior	obtuse rounded base	1128,2	831,8
<i>D. wilsonii</i>	conspicuous	triangular	1405,5	1429,3	center-inferior	obtuse flat base	1193,2	396,3

Table 4. Variations in the characters of epidermal cell in the middle third of the petal and the callus

Epidermal cell																
Petal on the middle third												Callus				
Epidermal cell					Cuticular relief							Epidermal cell		Cuticular relief		
Convex					Central field				Anticline field			Tabular		Striations		
					Striations				Radiated striations field central			Subtypes				
Anticlinal walls		Subtypes			Arranged		Not arranged		Long and linear above		Short and curved					
Species	U-undulated	straight	cupola	papilla	reticulum	edges	elevation	not elevation	smooth relief	concentric striations	smooth relief	in all area	polygonal	polygonal elongated	curved and irregular	parallel
<i>D.bicolor</i>	X		X		X				X				X		X	
<i>D.coriacea</i>	X		X		X				X					X	X	
<i>D.lasiophylla</i>	X		X	X			X				X		X		X	
<i>D.virgata</i>	X			X			X				X		X			X
<i>D.glabra</i>	X			X				X				X		X		X
<i>D.grandiflora</i>	X			X		X				X				X		X
<i>D.marginata</i>	X			X		X				X				X	X	
<i>D.schottii</i>	X			X		X						X		X		X
<i>D.sclerocarpa</i>	X		X	X				X		X				X		X
<i>D.violacea</i>	X		X	X		X						X		X		X
<i>D.wilsonii</i>		X		X				X				X		X	X	

Table 5. Variations in the characters of mesophyll in the region of the callus and channel

Species	Callus										Channel								
	Annular collenchyma		Lacunar collenchyma		N° layers of collenchyma				Parenchyma		Annular collenchyma		Lacunar collenchyma		N° layers of collenchyma				Parenchyma
	adaxial	abaxial	adaxial	abaxial	adaxial		abaxial		without	with	adaxial	abaxial	adaxial	abaxial	adaxial		abaxial		ground
					<5	≥5	<5	≥5							<5	≥5	<5	≥5	
<i>D. bicolor</i>	X	X			X	X			X	X	X	X			X	X			X
<i>D. coriacea</i>	X	X			X	X			X				X		X	X			X
<i>D. lasiophylla</i>	X	X			X	X		X		X	X				X	X			X
<i>D. virgata</i>	X	X			X	X		X		X			X		X	X			X
<i>D. glabra</i>	X			X		X	X	X		X			X		X		X		X
<i>D. grandiflora</i>	X			X		X	X	X		X			X		X		X		X
<i>D. marginata</i>	X			X		X	X	X		X			X		X		X		X
<i>D. schottii</i>	X			X		X	X	X		X			X		X		X		X
<i>D. sclerocarpa</i>	X			X		X		X		X			X		X		X		X
<i>D. violacea</i>	X			X		X		X		X			X		X		X		X
<i>D. wilsonii</i>	X			X		X	X	X		X			X		X		X		X

Table 6: Morphological and anatomical characters and their states used in the cluster analysis.

characters		character states			
		0	1	2	3
<b>Morphology</b>	1 Form callus in front view	rounded	triangular	rectangular	
	2 Amplitude of the thickness of the callus	<1000µm	>1000µm		
	3 Longitudinal position of the callus	basal-inferior	basal-superior	center-inferior	center-superior
	4 Opening angle of the channel	acute	obtuse to rounded base	obtuse flat base	
	5 Channel width	<500µm	500-1000µm	>1000µm	
	6 Channel depth	<500µm	500-1000µm	>1000µm	
	7 Anticlinal shape of the wall of the convex epidermal cell	U- undulating	straight		
	8 Subtypes of the convex epidermal cell	cupola	papilla		
	9 Type of arrangement in striations cuticular relief in the center field convex cell	reticulum	edges		
<b>Anatomy</b>	10 Distribution of striations irregular cuticular relief in the center field convex cell	concentrated forming an elevation	spread without forming an elevation		
	11 Striae long and linear in the field anticline	above smooth cuticular relief	above cuticular relief with striations concentric		
	12 Striae short and curved in the field anticline	above smooth cuticular relief	in all area of the field anticline		
	13 Subtypes of the tabular epidermal cell	polygonal	polygonal elongated		
	14 Type of arrangement in striations cuticular relief in the	curved e irregular	parallel		

---

tabular cell			
15	Location of annular collenchyma in mesophyll callus	adaxial	abaxial
16	Location of lacunar collenchyma in mesophyll callus	adaxial	abaxial
17	Number of layers in the adaxial collenchyma callus	<5	≥5
18	Number of layers in the abaxial collenchyma callus	<5	≥5
19	Organization of parenchyma cells in the callus	without large intercellular spaces	with large intercellular spaces
20	Location of annular collenchyma in the mesophyll in the channel	adaxial	abaxial
21	Location of lacunar collenchyma in the mesophyll in the channel	adaxial	abaxial
22	Number of layers in the adaxial collenchyma channel	<5	≥5
23	Number of layers in the abaxial collenchyma channel	<5	≥5
24	Type of parenchyma in the mesophyll channel	ground	other
25	Stratification of the epidermis	unistratified	pluriestratificada

---

Table 7. Morphological and anatomical data matrix

	acut	roundbas	flatbas	unistr	adax	abax	adax	abax	ccn1	ccn2	ccn1	ccn2	groun	L1	L2	L3	P4	P5	P6	trian	retan	round	BI	BS	CI	CS	E1	E2	polyg	polyg elong	irregul	
<i>D. bicolor</i>	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	
<i>D. coriacea</i>	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	
<i>D. lasiophylla</i>	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	
<i>D. virgata</i>	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	
<i>D. glabra</i>	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	
<i>D. grandiflora</i>	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	
<i>D. marginata</i>	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	
<i>D. schottii</i>	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	
<i>D. sclerocarpa</i>	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	
<i>D. violacea</i>	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	
<i>D. wilsonii</i>	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	
Cont.	paral	parirr	adax	abax	adax	abax	ccl1	ccl2	ccl1	ccl2	withou	with	U und	straig	cup	pap	retic	edge	elev	notelv	smoo	conc	smo	all	plur	unic						
<i>D. bicolor</i>	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	
<i>D. coriacea</i>	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	
<i>D. lasiophylla</i>	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	
<i>D. virgata</i>	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	
<i>D. glabra</i>	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	
<i>D. grandiflora</i>	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	
<i>D. marginata</i>	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	
<i>D. schottii</i>	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	
<i>D. sclerocarpa</i>	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0
<i>D. violacea</i>	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	
<i>D. wilsonii</i>	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	





Figure 1. Collection sites of all analyzed species. 1. *D. virgata*, Pará, Parauapebas. 2. *D. coriacea*, Pará, Parauapebas. 3. *D. bicolor*, Pará, Parauapebas. 4. *D. sclerocarpa*, Pará, Parauapebas. 5. *D. lasiophylla*, Ceará, Parque Botânico de Caucaia. 6. *D. marginata*, Bahia, Ibiraba. 7. *D. grandiflora*, Bahia, Estrada Itatim- Sta.Terezinha BA493. 8. *D. schottii*, Rio de Janeiro, Nova Friburgo. 9. *D. wilsonii*, Rio de Janeiro, Silva Jardim. 10. *D. violacea*, Rio de Janeiro, Niterói. 11. *D. glabra*, Distrito Federal, Brasília.

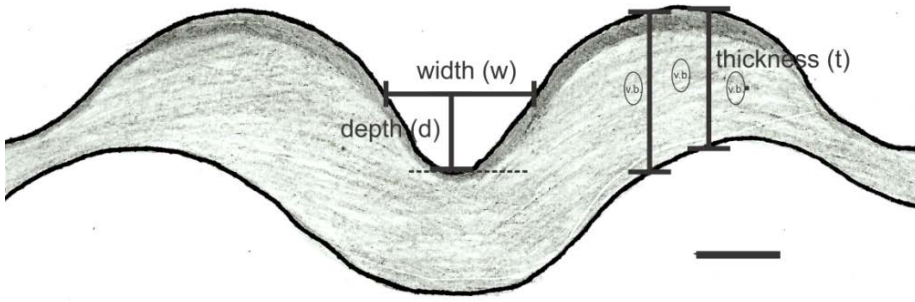


Figure 2. Measurements taken on the cross section of the middle portion of the callus

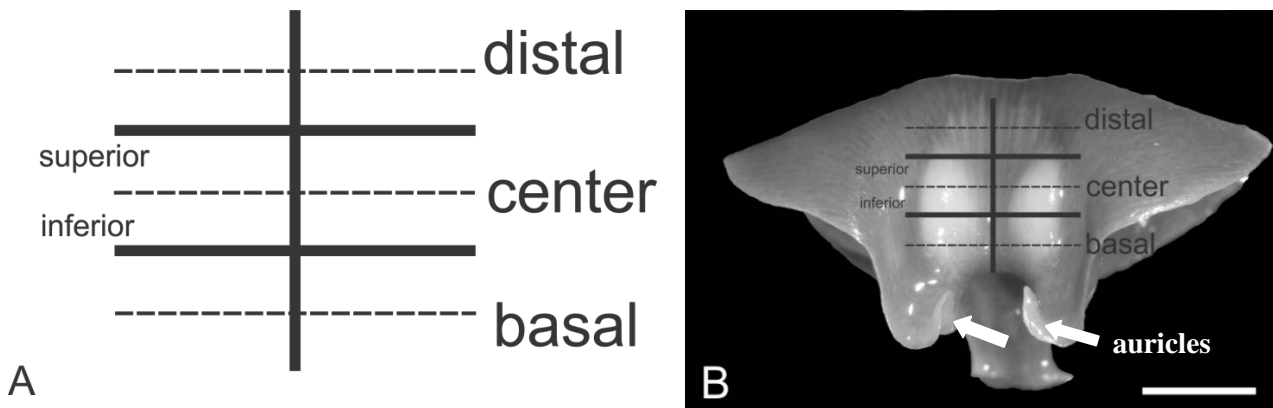
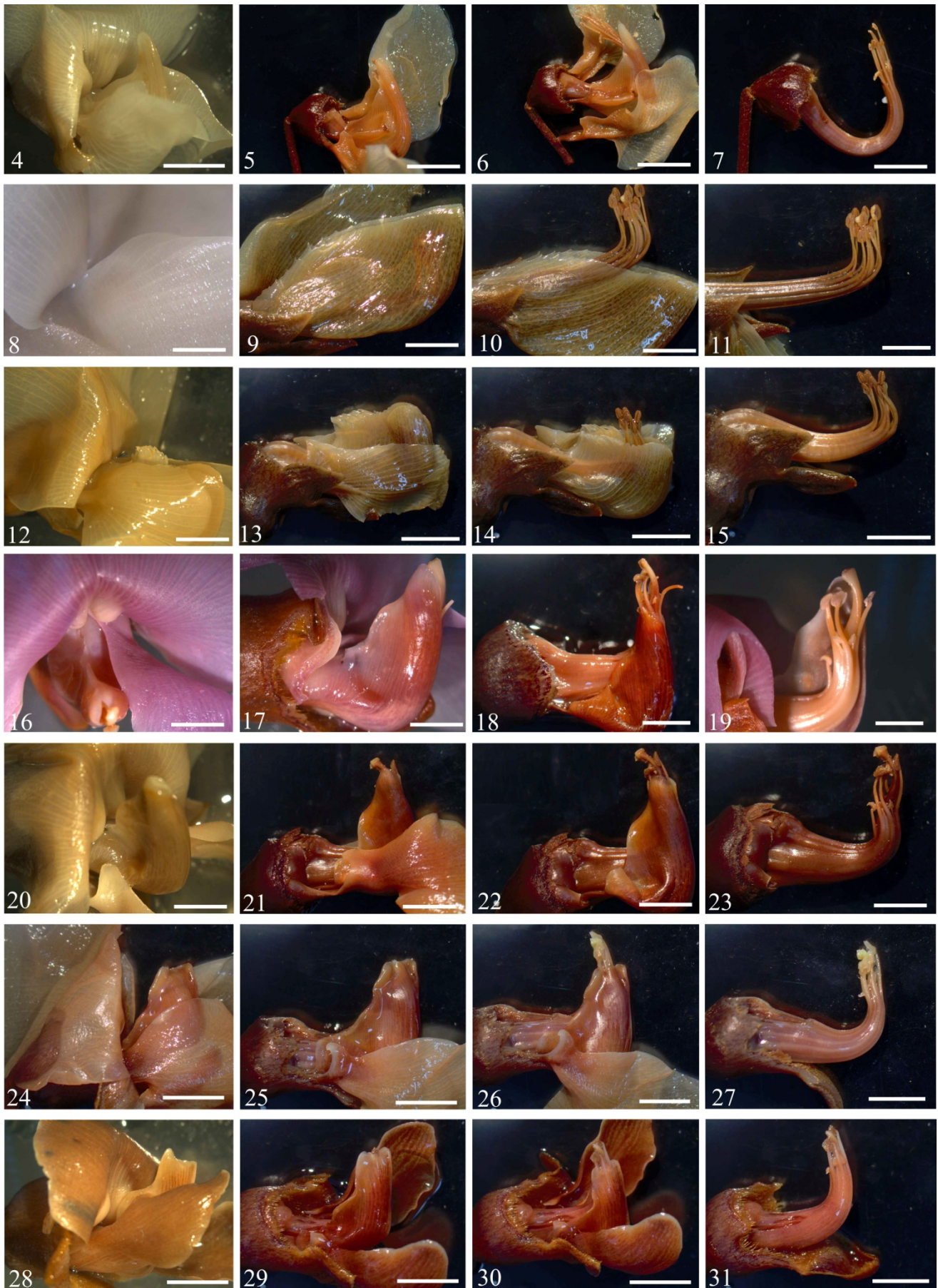
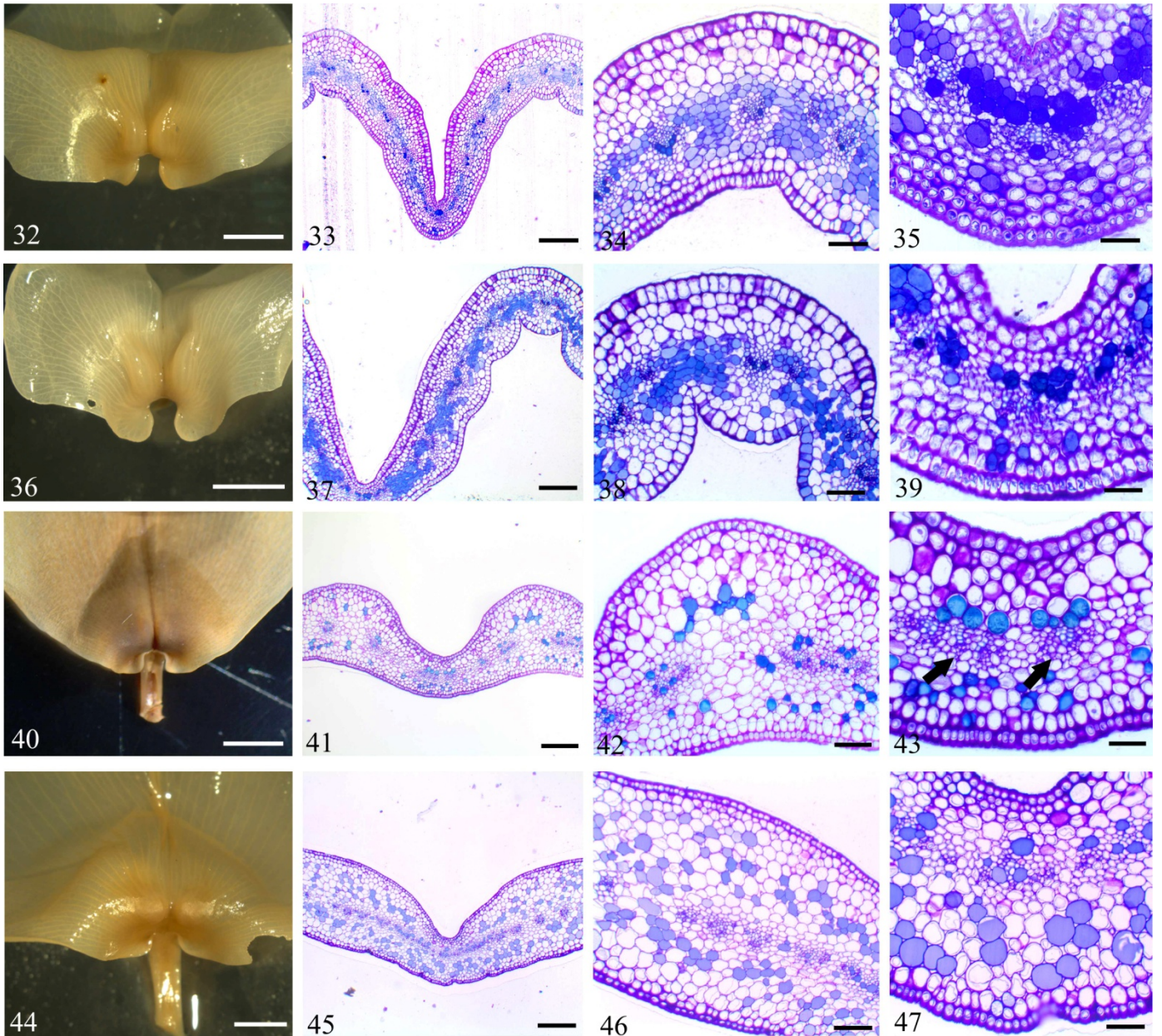


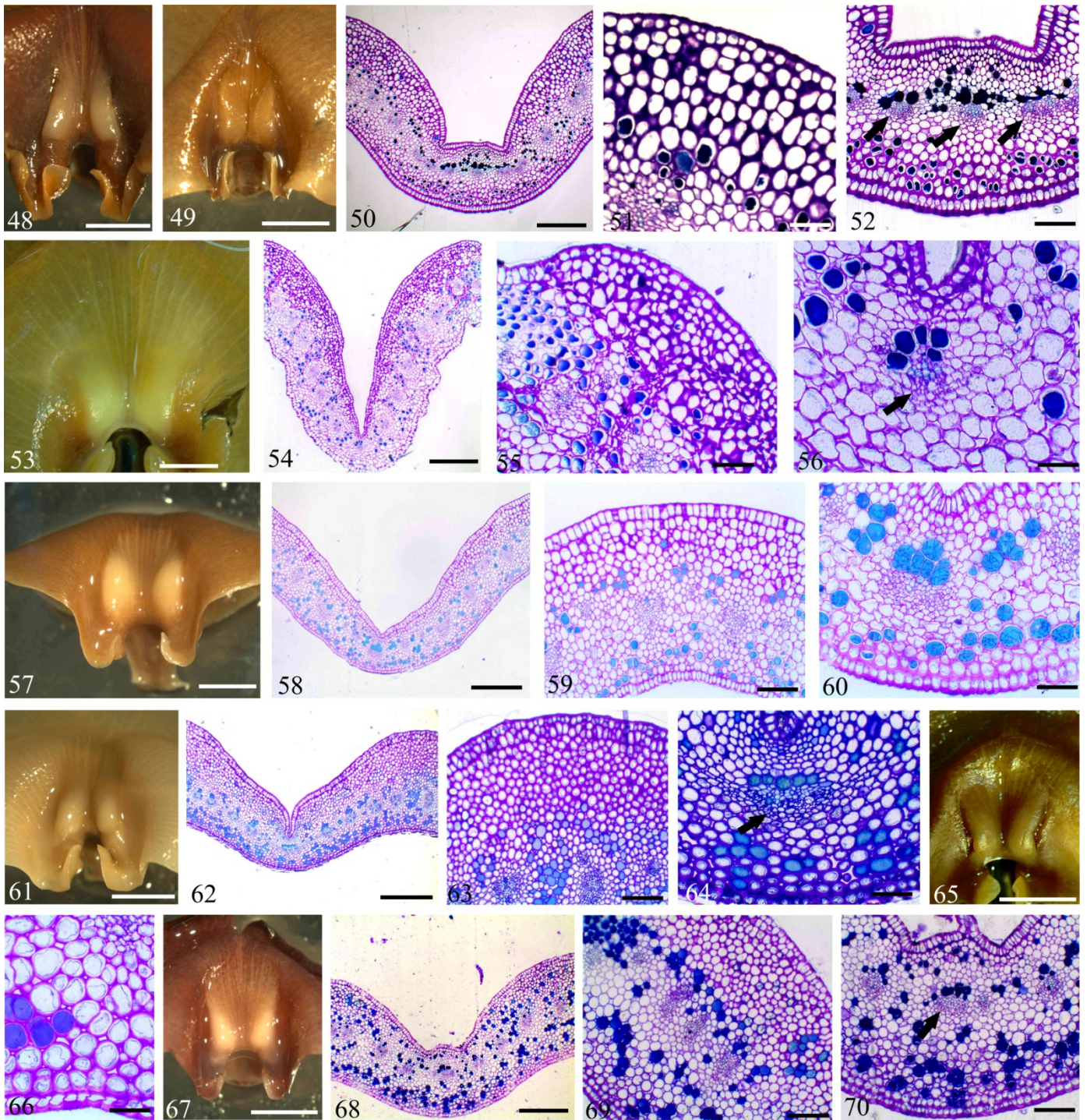
Figure 3. A. grid marked; B. example in flower *Dioclea schottii*.



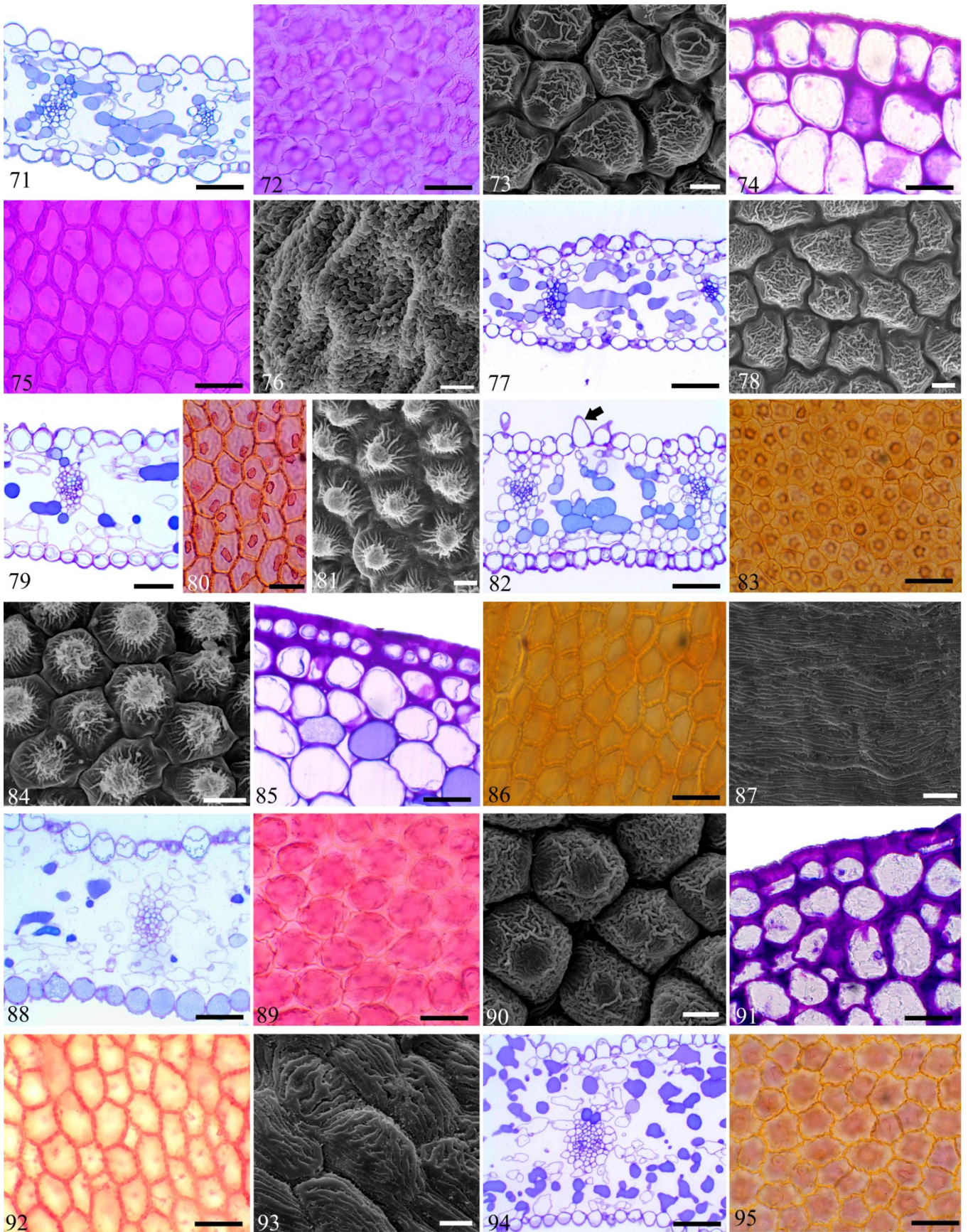
Exposure of the reproductive organs of species *Dioclea*. *D. coriacea*, figs. 4-7; *D. lasiophylla*, figs. 8-11; *D. virgata*, figs. 12-15; *D. glabra*, figs 16-19; *D. sclerocarpa*, figs. 20-23; *D. marginata*, figs. 24-27; *D. schottii*, figs. 28-31. Flower overview (figs.4, 8, 12, 16, 20, 24, 28); Keel (figs. 5, 9, 13, 17, 21, 25, 29); Output of the reproductive organs (figs. 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30) and Androecium (figs.7,11, 15, 19, 23, 27, 31). Bar=0,5cm



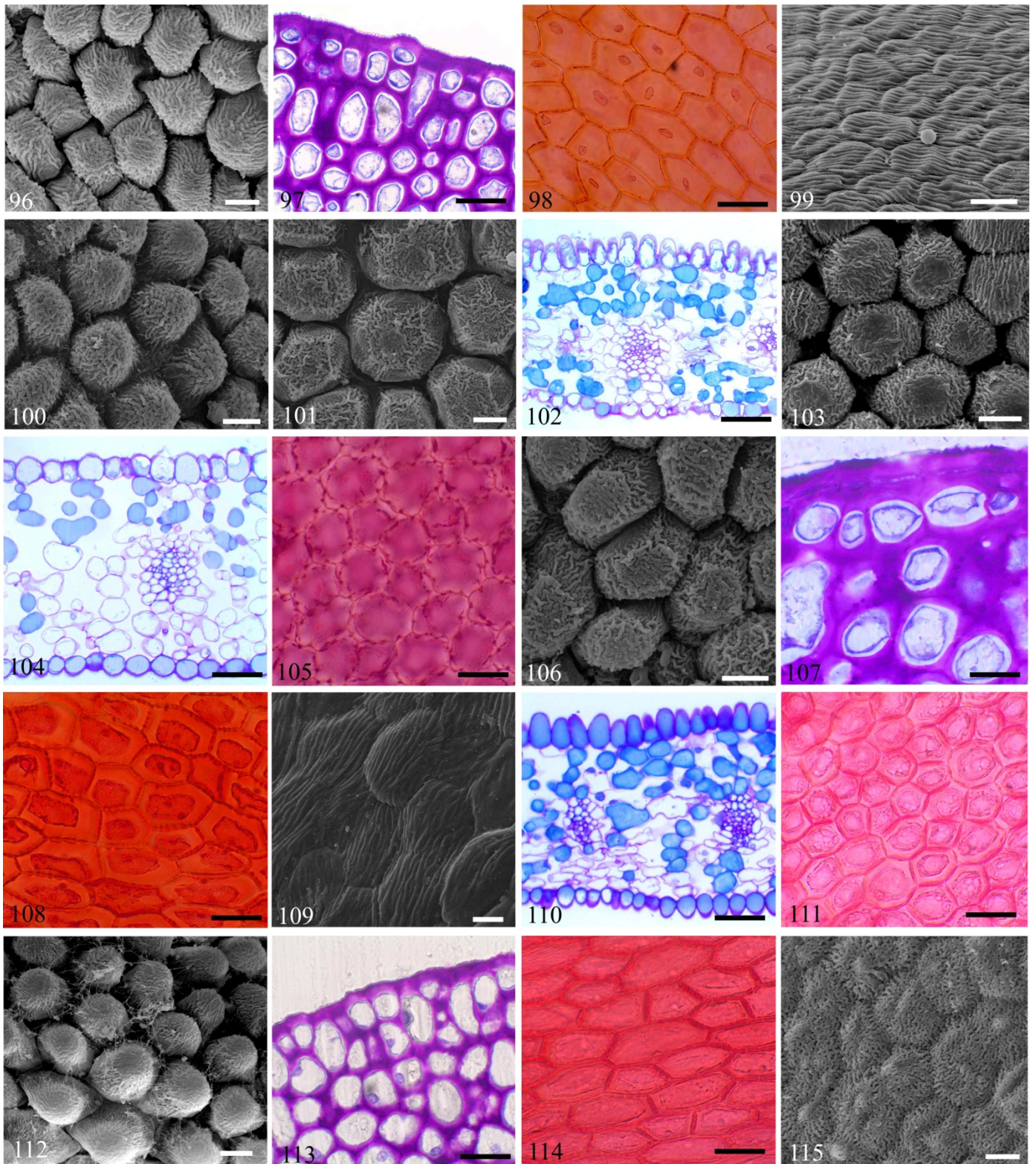
Morphology of the petal and anatomy of the mesophyll callus and channel in species *Dioclea*. *D. bicolor*, figs. 32-35; *D. coriacea*, figs. 36-39; *D. lasiophylla*, figs 40-43; *D. virgata*, figs. 44-47. Petal overview (figs. 32, 36, 40, 44); Callus overview (figs. 33, 37, 41, 45); Callus in detail (figs. 34, 38, 42, 46); Channel in detail (figs. 35, 39, 43, 47). Arrows= vascular bundles. Images of petals (bar=0,5cm). Optical microscopy images (bar=10µm)



Morphology of the petal and anatomy of the mesophyll callus and channel in species *Dioclea*. *D. glabra*, fig. 48; *D. grandiflora*, figs. 49-52; *D. marginata*, figs 53-56; *D. schottii*, figs. 57-60; *D. sclerocarpa*, figs. 61-64; *D. violacea*, figs. 65-66; *D. wilsonii*, figs. 67-70. Petal overview (figs. 48, 49, 53, 57, 61, 65, 67); Callus overview (figs. 50, 54, 58, 62, 68); Callus in detail (figs. 51, 55, 59, 63, 69); Channel in detail (figs. 52, 56, 60, 64, 70); Abaxial view callus (fig. 66). Arrows= vascular bundles. Images of petals (bar=0,5cm). Optical microscopy images (bar=10 $\mu$ m)



Epidermis on region of the middle third of standard petal and callus in species *Dioclea*. *D. bicolor*, figs.71-76; *D. coriacea*, figs. 77-78; *D. lasiophylla*, figs. 79-81; *D. virgata*, 82-87; *D. marginata*, figs. 88-93; *D. sclerocarpa*, figs. 94-95. Transversal section (figs. 71, 74, 77, 79, 82, 85, 88, 91, 94); Epidermis dissociated (figs. 72, 75, 80, 83, 86, 89, 92, 95); Images scanning electron microscopy (figs. 73, 76, 78, 81, 84, 87, 90, 93). Dark arrow (conical shaped cell). Optical microscopy images (bar=10μm). Images scanning electron microscopy (bar=20 μm)



Epidermis on region of the middle third of standard petal and callus in species *Dioclea*. *D. sclerocarpa*, figs. 96-99; *D. glabra*, fig. 100; *D. grandiflora*, fig. 101; *D. schottii*, 102-103; *D. violacea*, figs. 104-109; *D. wilsonii*, figs. 110-115. Transversal section (figs. 97, 102, 104, 107, 110, 113); Epidermis dissociated (figs. 98, 105, 108, 111, 114); Images scanning electron microscopy (figs. 96, 99, 100, 101, 103, 106, 109, 112, 115). Optical microscopy images (bar=10 $\mu$ m). Images scanning electron microscopy (bar=20  $\mu$ m)

# Cluster Dendrogram

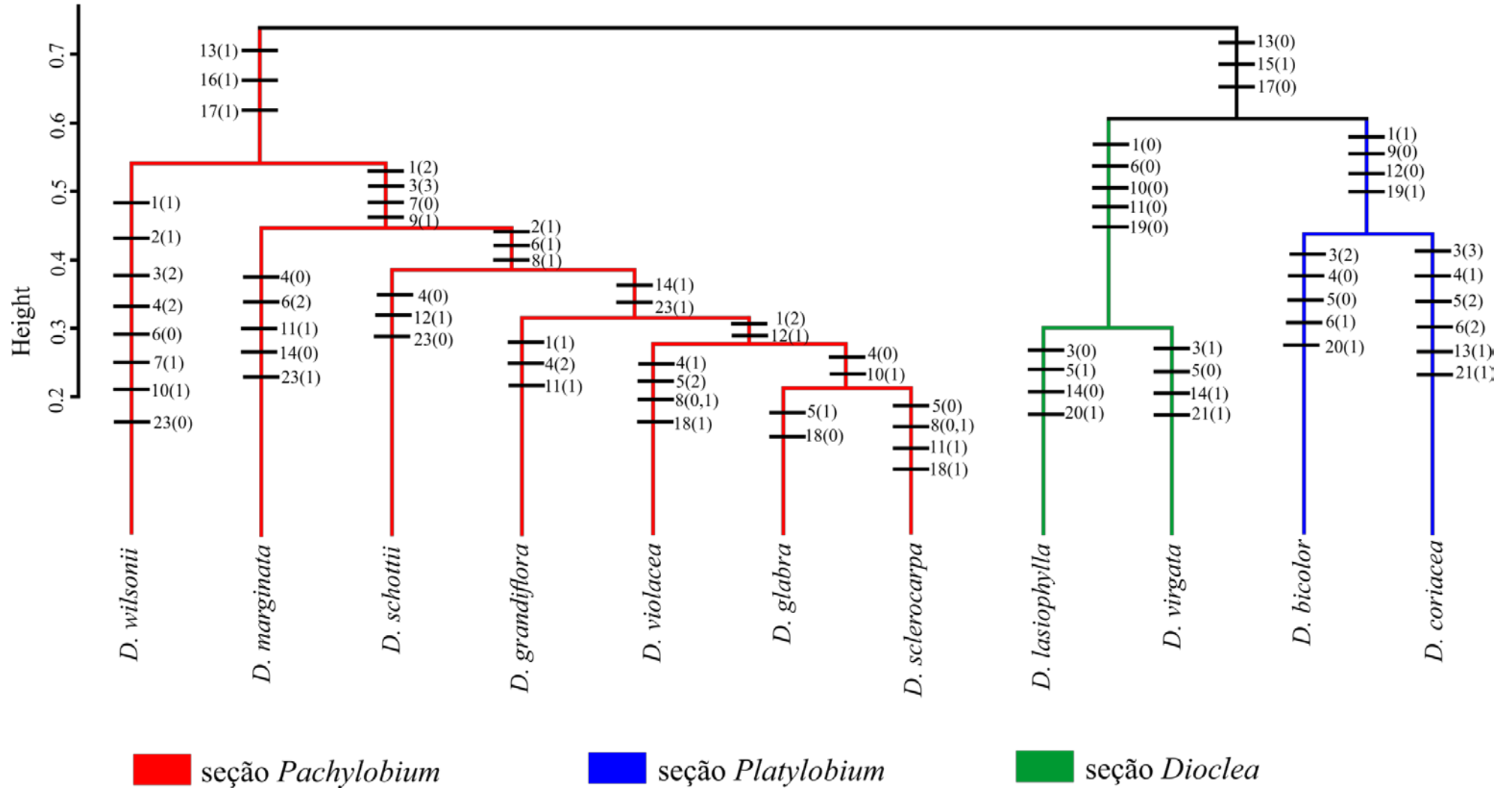


Figure 116. Cluster dendrogram of characters combined of *Dioclea* species



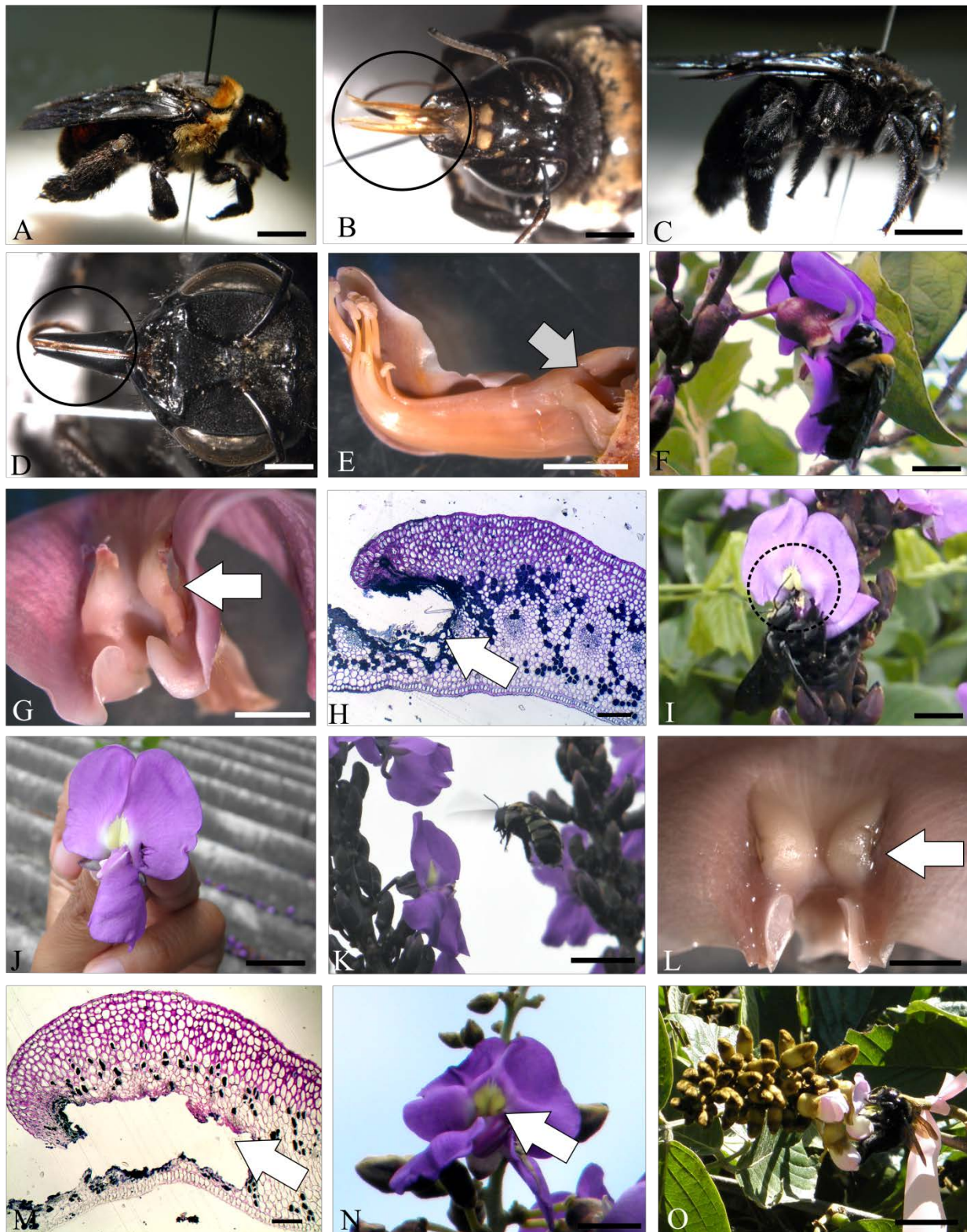


Figure 117. Behavior of bees *Centris* and *Xylocopa* in the flower of species *Dioclea*. A-B. *Centris (pilotopus) sponsa* bee and detail of the head, respectively; C-D. *Xylocopa* bee and detail of the head, respectively; E. fenestrated area in flower *D. glabra*; F. *Centris* bee on flower *D. glabra*; G-H. morphological and anatomical damage in callous area of standard petal, respectively; I. *Xylocopa* bee on flower *D. marginata*; J. damage on flower *D. marginata*; K. *Centris* bee approaching flower *D. marginata*; L-M. morphological and anatomical damage in the flower of *D. marginata*, respectively; N. damage in the callous area of the standard of the flower *D. grandiflora*; O. *Xylocopa* bee visiting the flower *D. schottii*; dark circles=mouthparts bee; dashed circle=distance of the jaw bee standard petal; gray arrow=fenestrated area; light arrows= damage in callous area. Optical microscope images (H, M), 42 (bar=10 $\mu$ m). Images lupa (bar=0,5cm). Photographic images (bar=1cm).

## References

- Andrade ALP. 2008. *A subfamília Faboideae (Fabaceae Lindl.) no Parque Estadual do Guatelá, Município de Tibagi, Estado do Paraná*. Dissertation, Federal University of Paraná, Brazil.
- Arroyo MTK. 1981. Breeding systems and pollination biology in Leguminosae. In: Polhill RM, Raven PH, eds. *Advances in legume systematics*. Royal Botanic Gardens, Kew 2: 723–767.
- Beck CB. 2005. *An introduction to plant structure and development*. 1st. Cambridge University Press.
- Barthlott W. 1990. Scanning electron microscopy of the epidermal surface in plants. In: Claugher D, editor. *Scanning electron microscopy in taxonomy and functional morphology*. Oxford: Clarend Press, 69-94.
- Córdoba SA, Cocucci AA, 2011. Flower power: its association with bee power and floral functional morphology in papilionate legumes. *Annals of botany* 108: 919-931.
- Cronk Q, Ojeda I. 2008. Bird-pollinated flowers in an evolutionary and molecular context. *Journal of experimental botany* 59 (4): 715-727.
- Endress PK. 1994. *Diversity and evolutionary biology of tropical flowers*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Endress PK, Matthews ML. 2006. Elaborate petals and staminodes in eudicots: diversity, function and evolution. *Organisms, diversity & evolution* 6: 257-293.
- Etcheverry AV, Alemán MM, Fleming TF. 2008. Reproductive biology of *Vigna caracalla*. *Annals of botany* 102: 305-316.
- Evert RF. 2006. *Esau's plant anatomy: meristems, cells and tissues of the plant body: their structure, function and development*. 3th edn. Hoboken, New Jersey.
- Fahn A. 1990. *Plant anatomy*. 4th. Pergamon Press.
- Franco ALM. 1995. *Ecologia da polinização e biologia reprodutiva de sete espécies de Phaseoleae (Fabaceae)*. PhD Thesis. Universidade de Campinas, Brazil.
- Haddad A, Sesso A, Attias M, et al. 1998. *Técnicas básicas de Microscopia Eletrônica aplicada às Ciências Biológicas*. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica.
- Johansen DA. 1940. *Plant microtechnique*. New York, MacGraw-Hill Book Company, Inc.
- Kawabata S, Nii K, Yokoo M. 2011. Three-dimensional formation of corola shapes in relation to the developmental distortion of petals in *Eustoma grandiflorum*. *Scientia horticultrae* 132: 66-70.

- Kevan PG, Lane MA. 1985. Flower petal microtexture is a tactile cue for bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 82: 4750-4752.
- Klitgaard BB. 1999. Floral ontogeny in tribe Dalbergieae (Leguminosae: Papilionoideae): *Dalbergia brasiliensis*, *Machaerium villosum* s.l. *Platymiscium floribundum* and *Pterocarpus rotundifolius*. *Plant systematics and evolution* 219: 1-25.
- Koch K, Bhushan B, Barthlott W. 2009. Multifunctional surface structures of plants: An inspiration for biomimetics. *Progress in materials science* 54: 137-178.
- Lackey JA. 1981. Phaseoleae. In: Polhill RM, Raven PH, eds. *Advances in legume systematics*. Royal Botanic Gardens, Kew 1: 301-327.
- Le Roux MM, Van Wyk BE. 2012. The systematic value of flower structure in *Crotalaria* and related genera of the tribe Crotalarieae (Fabaceae). *Flora* 207: 414-426.
- Leroux O. 2012. Collenchyma: a versatile mechanical tissue with dynamic cell walls. *Annals of botany* 110: 1083-1098.
- Martin C, Glover B. 2007. Functional aspects of cell patterning in aerial epidermis. *Current opinion in plant biology*. 10: 70-82.
- Maxwell RH. 1969. *The genus Dioclea (Fabaceae) in the new world*.1. PhD. Thesis. Southern Illinois University
- Maxwell RH.1980. *Dioclea*. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 67: 662-675.
- Maxwell RH, Taylor DW. 2003. Phylogenetic relationships of the Diocleinae with particular emphasis on the subgroups of *Dioclea*. In: Klitgaard BB, Bruneau A. eds. *Advances in legume systematics*. Higher Level Systematics, Royal Botanic Gardens, Kew 10: 325-353..
- O'Brien TP, McCully ME. 1981. *The study of plant structure: principles and selected methods*. Melbourne, Vic. Australia: Termarcarphi Pty. Ltd.
- Ojeda I, Francisco-Ortega J, Cronk QCB. 2009. Evolution of petal epidermal micromorphology in Leguminosae and its use as a marker of petal identity. *Annals of Botany* 104: 1099-1110.
- Polhill RM. 1976. Genisteae (Adans.) Benth. and related tribes (Leguminosae). *Botanical Systematics* 1: 143-368.
- Queiroz LP. 1998. A new cauliflorous species of *Dioclea* Kunth. (Leguminosae: Phaseoleae) from southeastern Brazil. *Novon* 8: 433-435.
- Queiroz LP. 1999. *Sistemática e filogenia do gênero Camptosema* W.J. Hook. & Arn. (Leguminosae: Papilionoideae: Phaseoleae). PhD. Thesis. University of São Paulo, Brazil.

- Queiroz LP. 2012. *Dioclea*. In: *Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro*. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB022941>).
- Queiroz LP, Fortunato RH, Giuliatti AM. 2003. Phylogeny of the Diocleinae (Papilionoideae: Phaseoleae) based on morphological characters. In: Klitgaard BB, Bruneau A. eds. *Advances in legume systematics*. Higher Level Systematics, Royal Botanic Gardens, Kew 10: 303-324.
- Queiroz LP, Sakuragui CM, Souza VC. 2004. Flora de Grão Mongol, Minas Gerais: Leguminosae. *Boletim de botânica (USP)*. 22 (2): 213-265
- R CORE TEAM R. 2012. A language and environment for statistical computing. R Foundation for statistical Computing, Viena, Austria. URL <http://www.R-project.org/>
- Schrire BD. 1989. A multidisciplinary approach to pollination biology in the Leguminosae. Stirton CH, Zarucchi JL. eds. *Advances in legume biology*. Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden 29: 183-242.
- Schrire GP, Lewis GP, Lavin M. 2005. Biogeography of the Leguminosae. In: Lewis GP, Schrire BD, Mackinder B, Lock J M. eds. *Legumes of the world*. Royal Botanic Gardens, Kew England 21-54
- Stirton CH. 1981. Petal sculpturing in papilionoide legumes. In: *Advances in legume systematics*, Polhill RM, Raven PH, eds. 771-788.
- Tucker SC. 2003. Floral ontogeny in *Swartzia* (Leguminosae: Papilionoideae: Swartzieae): distribution and role of the ring meristem. *American Journal of Botany* 90 (9): 1271–1292.
- Vaes E, Vrijdaghs A, Smets E, Dessein S. 2006. Elaborate petals in australian Spermacece (Rubiaceae) species: morphology, ontogeny and function. *Annals of botany* 98: 1167-1178.
- Varela ES, Lima JP, Galdino AS, *et al.* 2004. Relationships in subtribe Diocleinae (Leguminosae; Papilionoideae) inferred from internal transcribed spacer sequences from nuclear ribosomal DNA. *Phytochemistry*. 65: 59–69.
- Weberling F. 1989. *Morphology of flowers and inflorescences*. Cambridge. Cambridge University Press.
- Westerkamp C. 1997. Keel blossoms: bee flowers with adaptations against bees. *Flora* 192: 125-132.
- Westerkamp C, Paul H. 1993. *Apios americana*, a fly-pollinated papilionaceous flower? *Plant systematics and evolution* 187: 135-144.
- Westerkamp C, Weber A. 1999. Keel flowers of the Polygalaceae and Fabaceae: a functional comparison. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 129: 207-221.

Whitney HM, Chittka L, Bruce TJA. 2009. Conical epidermal cells allow bees to grip flowers and increase foraging efficiency. *Current biology* 19, 948-953.

Artigo II

**Desenvolvimento calo na pétala estandarte em espécies de *Dioclea* Kunth.  
(Leguminosae, Papilionoideae, Diocleinae)**

Artigo a ser submetido para publicação na revista Flora

## **Desenvolvimento do calo na pétala estandarte em espécies de *Dioclea* Kunth. (Leguminosae, Papilionoideae, Diocleinae)**

### Resumo

O calo presente nas flores das espécies de *Dioclea* é caracterizado como uma pareada protuberância localizada na face dorsal das pétalas estandartes. Exibe variação interespecífica, quanto ao aspecto conspícuo e inconspícuo, o que possibilitou a sua aplicação como um caráter útil em análises filogenéticas, além de desempenhar funções importantes na polinização. Embora a estrutura seja referida tanto em estudos de sistemática quanto ecológicos é desconhecida sua origem. Pretende-se no presente estudo caracterizar o desenvolvimento da estrutura calosa em quatro espécies de *Dioclea*. Todas as espécies analisadas (*Dioclea bicolor*, *D. lasiophylla*, *D. grandiflora* e *D. sclerocarpa*) possuem calo que se origina de divisões no meristema fundamental na região adaxial da lâmina. Na espécie com calo inconspícuo (*D. lasiophylla*) a diferenciação da protoderme e do meristema fundamental em epiderme uniestratificada e colênquima, respectivamente, ocorre na porção basal da pétala. Já nas espécies com calo conspícuo a epiderme pluriestratificada e o colênquima diferenciam-se na região mediana da pétala estandarte. O desenvolvimento do calo apresenta forte correlação com os diferentes aspectos apresentados (conspícuo e inconspícuo) e a complexidade revelada nas espécies da seção *Pachylobium* sugere um ecotipo de polinização, pois constitui uma especialização da estrutura, relacionado a um modo particular de polinização.

**Palavras-chave:** Ontogenia, calo, *Dioclea*, colênquima, epiderme pluriestratificada, ecotipo de polinização.

## Introdução

A principal diferenciação evolutiva e elaboração nas pétalas ocorreu nos grandes clados de eudicotiledôneas especialmente nas rosídeas (Endress & Matthews 2006). Pétalas desenvolveram no curso da evolução com insetos polinizadores (Weberling 1989, Rose De Craene 2007) elaborações com diversos padrões que consistem em lobos ventrais ou marginais, um ápice elaborado, invaginações dorsais ou ventrais que resultam em escamas ou esporões, nectários e pseudonectários. Tais elaborações desempenham diferentes funções na flor além da atração (Endress & Matthews 2006).

Recentes trabalhos sobre estruturas elaboradas nas pétalas tem revelado diferentes estruturas em flores de diferentes famílias como: esculturações nas pétalas das alas de flores de espécies Papilionoideae (Stirton 1981), apêndices de diferentes formas em Bromeliaceae (Brown & Terry 1992), apêndices semelhantes a tricomas nas pétalas de espécies do gênero *Spermacoce* Rubiaceae (Vaes *et al.* 2006), manchas com diferentes padrões de pigmentação na pétala de *Gorteria diffusa* (Asteraceae) (Thomas *et al.* 2009) e lobos ou calos presentes na face dorsal da pétala estandarte em diferentes táxons de Papilionoideae (Schrire 1981, Etcheverry 2009, Le Roux & Van Wyk 2012). Em tais estudos foram produzidas classificações e novas terminologias para as estruturas elaboradas e informações sobre a ontogenia e a micromorfologia de flores que portam tais estruturas e descritas as variações em sua localização e morfologia, entretanto poucos trabalhos (Brown & Terry 1992, Vaes *et al.* 2006 e Thomas *et al.* 2009) realizaram o estudo do desenvolvimento dessas estruturas elaboradas.

Estudos de desenvolvimento são importantes pois revelam a origem de vários aspectos da diversidade dentro de grupos relacionados de plantas, além de permitir o esclarecimento de caracteres através da possibilidade de informações sobre os processos de crescimento de um órgão ou de uma estrutura (Tucker 1997). Aliado aos estudos de desenvolvimento a caracterização anatômica de divisões e expansão celulares permite determinar a morfogênese de um órgão com um determinado padrão de desenvolvimento (Reale *et al.* 2002). Nas Papilionoideae, por exemplo, foi possível correlacionar, a partir de inúmeros estudos sobre o desenvolvimento de flores, que estruturas elaboradas como dobras, esculturações nas alas, aurículas e calosidades na base do estandarte tem sua expressão tardia na ontogenia floral e constituem caracteres especializados, diagnósticos de espécies, sendo relativamente variáveis e portanto suscetíveis a adaptações as mudanças externas diversas dentre elas a dos sistemas de polinização (Tucker 1997)



O calo floral caracteriza-se como uma única ou pareada protuberância presente na face dorsal da pétala estandarte das Leguminosae (Lackey 1981, Westerkamp 1997, Etcheverry *et al.* 2008, Le Roux & Van Wyk 2012), observadas em diferentes táxons dentre eles: Crotalarieae e Phaseoleae (Papilionoideae) (Lackey 1981, Le Roux & Van Wyk 2012). Na subtribo Diocleinae (Phaseoleae) o calo ocorre em *Collaea speciosa*, *Canavalia rosea*, *C. picta*, *C. matogrossensis*, *Camptosema ellipticum*, *C. praeandinum*, *Galactia glaucescens* e *G. grewiaefolia* (Lackey 1981, Queiroz 1999, Queiroz *et al.* 2003, Andrade 2008). No gênero *Dioclea*, tal estrutura ocorre na maioria das espécies, e caracteriza-se por um par de protuberâncias localizadas na base da pétala, indicando um importante caráter nas análises filogenéticas morfológicas (Queiroz *et al.* 2003, Maxwell & Taylor 2003). Além da sua importância na separação das espécies, Franco (1995) refere que o calo desempenha importante papel na polinização, pois tais protuberâncias agem como guia de língua para abelhas polinizadoras e como ponto de apoio para as mesmas executarem o mecanismo de polinização.

Apesar da importância da estrutura para o gênero, são desconhecidos estudos sobre a sua anatomia e ontogênese. O presente estudo tem por objetivo descrever a anatomia do desenvolvimento do calo em quatro espécies do gênero *Dioclea* distribuídas em três seções. As espécies selecionadas apresentam calosidades com diferentes aspectos: inconspícuos, como em *Dioclea lasiophylla* e conspícuos, como em *D. bicolor*, *D. grandiflora* e *D. sclerocarpa*, segundo Peçanha (2014). Pretende-se com base nas informações obtidas responder as seguintes perguntas: 1- O desenvolvimento do calo nas espécies de *Dioclea* corrobora a hipótese de Tucker (1997) que correlaciona a expressão tardia do desenvolvimento floral a caracteres mais especializados? 2 - Existem diferenças entre o desenvolvimento do calo inconspícuo de *D. lasiophylla* e as demais espécies com calo conspícuo selecionadas para o presente estudo? O padrão de desenvolvimento do calo pode contribuir na separação das espécies do gênero?

## Material e métodos

No presente estudo foram analisadas quatro espécies pertencentes a três seções de *Dioclea*, que apresentam calos com morfologia e anatomia diferenciadas segundo informações do artigo I: *Dioclea bicolor* Benth., seção *Platylobium*, *D. lasiophylla* Mart ex Benth., seção *Dioclea*; *D. grandiflora* Mart. ex Benth. e *D. sclerocarpa* Ducke, seção *Pachylobium* (Tabela 1). Os vouchers dos espécimes estão depositados no Herbário do Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro (RB) e os números de registro, bem como os dados de procedência estão relacionados na Tabela 1.

Tabela 1. Espécies selecionadas, aspecto do calo e vouchers.

Seções	Calo		Voucher
	Conspícuo	Inconspícuo	
<i>Pachylobium</i>	<i>D. grandiflora</i>		RB501973
	<i>D. sclerocarpa</i>		RB511905
<i>Dioclea</i>		<i>D. lasiophylla</i>	RB544867
<i>Platylobium</i>	<i>D. bicolor</i>		RB511906













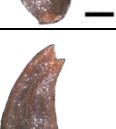
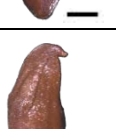






Inflorescências com flores em botão e em antese foram fixadas em FAA 70% (Johansen 1940), e posteriormente transferidas para etanol 70%, ou em etanol 70%. Os botões foram classificados em três estágios de acordo com o seu comprimento (Tabela 2). Dos botões florais em diferentes estágios de desenvolvimento foram dissecadas a pétala estandarte.

Para análise em microscopia óptica as pétalas estandarte foram submetidas a desidratação em série alcoólica, infiltradas em Histo-resina (hidroxietilmetacrilato, Leica Heidelberg), cortadas transversalmente em espessura média de 3-4  $\mu\text{m}$  com navalha de vidro ao micrótomo rotativo elétrico modelo Leica RM2245. As seções obtidas foram coradas com azul de toluidina (O'Brien & McCully 1981) e as lâminas permanentes produzidas foram observadas e documentadas ao microscópio óptico Olympus BX-50, equipado com câmera digital Olympus DP73.

Para análise em microscopia eletrônica de varredura as pétalas estandarte em diferentes estágios de desenvolvimento foram desidratadas em série etanólica até 100% e secas ao ponto

crítico modelo Leica EM CPD 030. Após esse processo, o material foi montado em suportes de alumínio utilizando fita adesiva dupla face de carbono e cola de prata, metalizado com uma fina camada de ouro no equipamento modelo Denton Vacuum LLC, Desk IV e em seguida observadas ao microscópio de varredura JEOL JSM6390LV.

Tabela 2. Estágios dos botões de espécies de *Dioclea* de acordo com o seu comprimento em milímetros.  
Barra=2mm

Estágios	Botão	<i>D. lasiophylla</i>	<i>D. bicolor</i>	<i>D. grandiflora</i>	<i>D. sclerocarpa</i>
1	30mm				
2	40mm				
	60mm				
	70mm				
3	90mm				

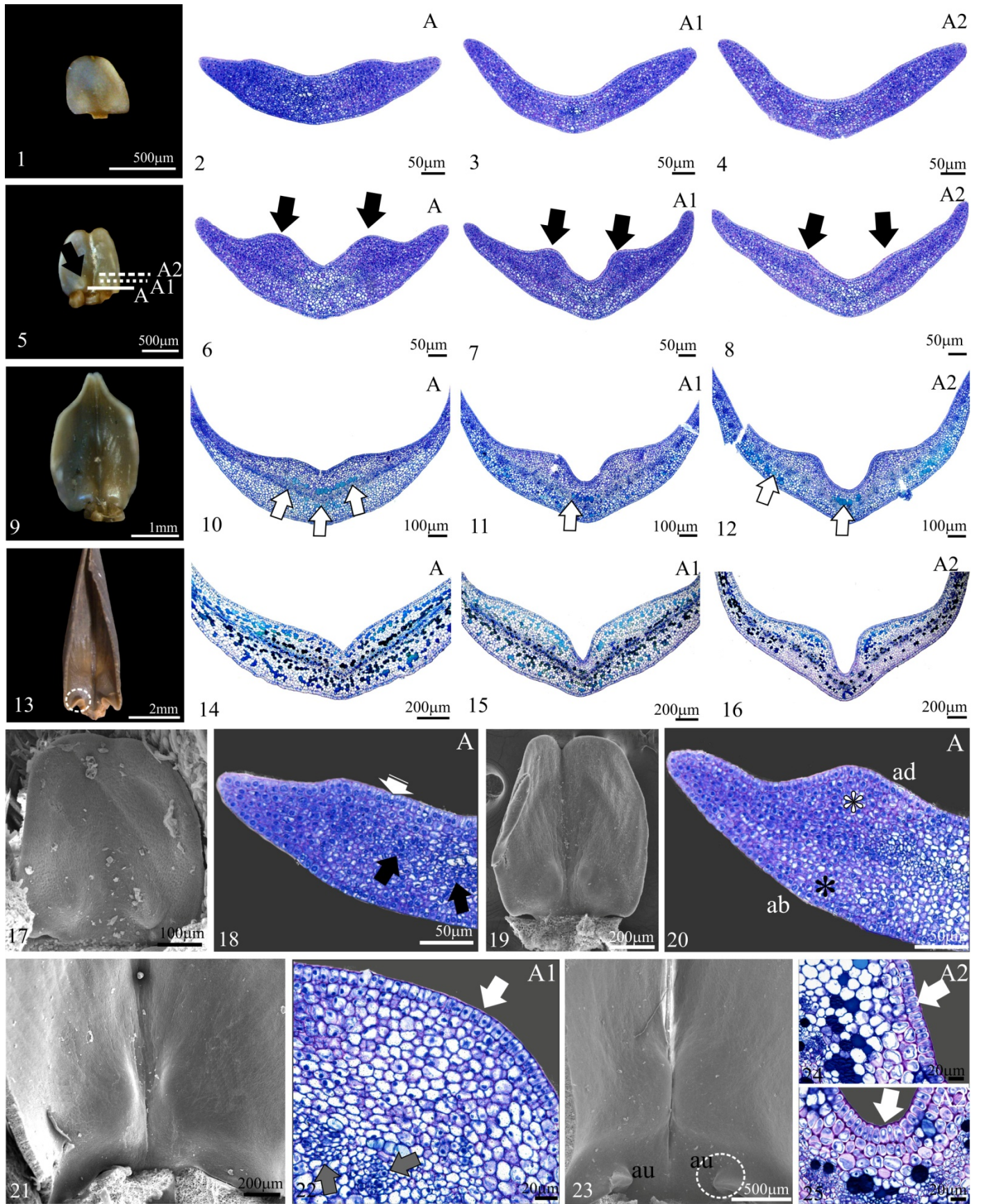
## Resultados

A formação do calo em todas as espécies tem início em botões com 30 mm de comprimento (Tabela 2). Nessa etapa as pétalas em diferenciação de *D. lasiophylla* (Figs. 1, 17), *D. bicolor* (Figs. 26, 42), *D. grandiflora* (Figs. 51, 67) e *D. sclerocarpa* (Figs. 77, 93) apresentam protoderme uniestratificada, o meristema fundamental, o procâmbio em pequenos grupos na porção central da lâmina da pétala e o meristema marginal na região do bordo (Figs. 18, 43, 68, 94). Os primeiros indícios do surgimento do calo são divisões celulares em diversos planos, mas preferencialmente periclinais, observadas nas células do meristema fundamental localizadas na porção adaxial da lâmina da pétala estandarte em diferenciação, acompanhadas por divisões anticlinais das células da protoderme (Figs. 18, 43, 68, 94, cabeça de seta branca). Tais divisões são inicialmente mais evidentes na base da pétala (Figs. 2, 27, 52, 78) e posteriormente se estendem até a porção mediana da lâmina da pétala em *D. bicolor* (Figs. 42, 44, 47, 49), *D. grandiflora* (Figs. 67, 69, 71, 74), *D. sclerocarpa* (Figs. 93, 95, 97, 99) ou permanecem na base da mesma em *D. lasiophylla* (Figs. 17, 19, 21, 23).

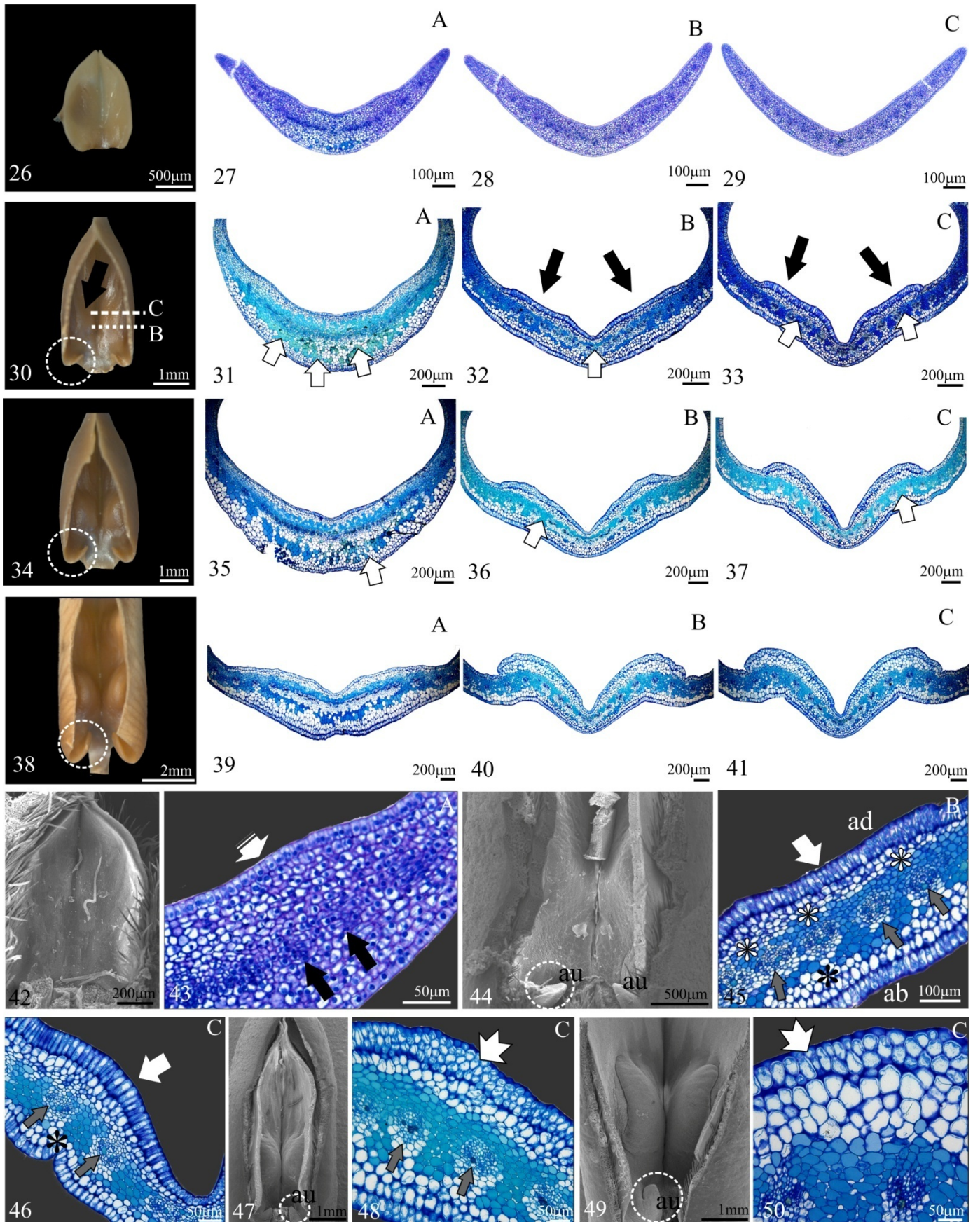
Em botões florais entre 40-70 mm de comprimento, a proliferação celular na região da protuberância faz com que a mesma mostra-se proeminente e delimite um canal (Figs. 5-8, 30, 32, 33, 55, 57, 58, 81, 84, 85, 88, setas escuras). Essa intensa atividade, mitótica mantém a porção adaxial da lâmina da pétala ainda meristemática (Figs. 20, 45, 70, 72, 73, 96, 98, asterisco branco) enquanto o ritmo das divisões celulares na porção voltada à face abaxial torna-se mais lento e suas células mais vacuolizadas indicam o início do alongamento e diferenciação celular (Figs. 20, 45, 46, 70, 72, 73, 96, asterisco escuro). Nessa etapa é possível identificar a diferenciação do sistema vascular a partir do procâmbio, na porção central da lâmina da pétala estandarte, assim como dos idioblastos taniníferos, dispersos por toda a lâmina da pétala (Figs. 10, 11, 12, 31, 32, 33, 35, 36, 37, 45, 46, 48, 56, 57, 58, 60, 61, 62, 70, 72, 73, 82, 83, 84, 86, 87, 88, 96, setas).

A diferenciação do colênquima nos estratos adjacentes às epidermes da face adaxial e abaxial inicia-se em pétalas estandartes jovens de botões com cerca de 70 mm de comprimento (Fig. 48) e está finalizada em botões com cerca de 90 mm de comprimento (Figs. 24, 25, 50, 75, 100.). O alongamento e espessamento das células do colênquima localizado na porção adaxial torna o calo mais proeminente, principalmente nas regiões B e C, mais próximas da porção mediana da lâmina da pétala (Figs. 34, 36, 37, 38, 40, 41, 47, 49, 59, 61, 62, 63, 65, 66, 71, 74, 85, 88, 89, 91, 92, 99), exceto em *D. lasiophylla* que permanece na base da pétala (Figs. 9, 11, 12, 13, 15, 16, 21, 23)

Diferenças observadas na ontogênese dos calos dos tipos conspícuo e inconspícuo, diz respeito ao surgimento das aurículas, as etapas finais da diferenciação da protoderme adaxial e a posição final do calo na lâmina. Em *D. lasiophylla* as aurículas surgem quando o calo já está completamente formado (Figs. 13, 23, círculo tracejado branco), enquanto que nas demais espécies, com calo conspícuo, as aurículas são formadas simultaneamente com o desenvolvimento do calo (Figs. 30, 34, 38, 44, 47, 49, 55, 59, 63, 69, 71, 74, 81, 85, 89, 97, 99, círculo tracejado branco). Nas etapas finais da diferenciação da protoderme adaxial, em pétalas provenientes de botões com cerca de 80 mm de comprimento, as células protodérmicas se alongam e suas paredes se espessam, dando origem a uma epiderme uniestratificada (Figs. 22, 24, 25, setas brancas) e todo o desenvolvimento do calo permanece na região basal da lâmina. Entretanto, nas demais espécies que possuem calo do tipo conspícuo as células protodérmicas adaxiais da região do calo sofrem divisões no plano periclinal, de forma que na estrutura totalmente diferenciada a epiderme adaxial da região do calo é pluriestratificada (Figs. 48, 50, 72, 73, 75, 98, 100, 101, 102, setas brancas de ponta dupla), enquanto nas demais regiões da pétala a mesma se mantém uniestratificada (Fig. 76) e todo processo ocorre acima da região da base, próxima a porção mediana da lâmina.

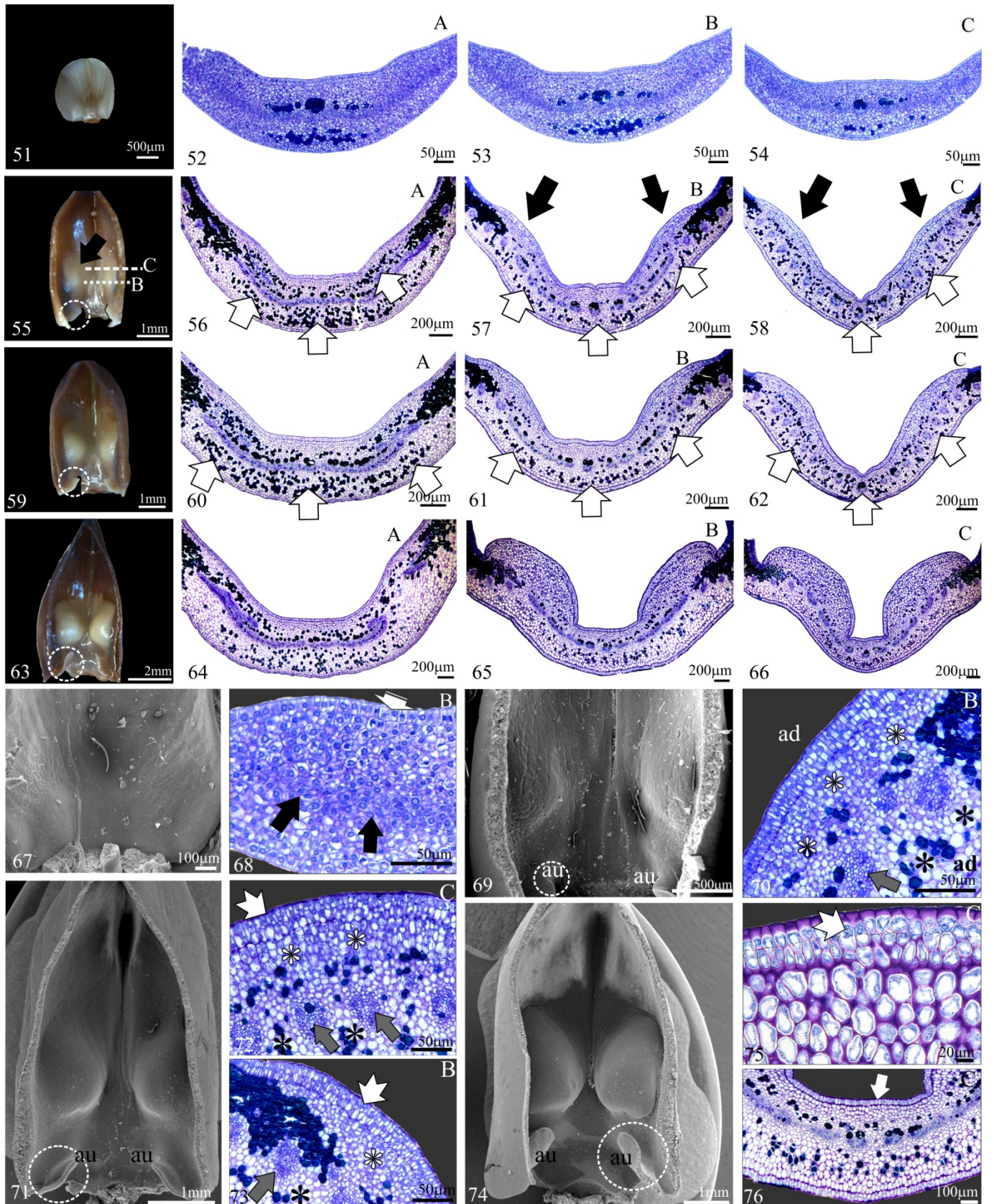


**Desenvolvimento do calo em *D. lasiophylla*** (Figs. 1-25). Pétala em microscopia óptica e sequencia de secções transversais na região basal da lâmina (A,B, C). Figs. 1-4, botão com 30mm; Figs. 5-8, botão com 60mm; Figs. 9-12, botão com 70mm; Figs. 13-16, botões com 90mm. Pétala em microscopia de varredura e detalhe das estruturas nos respectivos tamanhos de botão. Figs. 17-18, botão com 30mm; Figs. 19-20, botão com 60mm; Figs. 21-22, botão com 70mm; Figs. 23-25, botão com 90mm. ad= face adaxial, ab= face abaxial; au=aurículas; seta escura=procâmbio; seta cinza= feixes vasculares; seta branca com margem escura= idioblastos taniníferos; seta branca=epiderme unisseriada; seta branca com ponta dupla= epiderme plurisseriada; cabeça de seta branca=divisões anticlinais na protoderme uniestratificada; asterisco branco= região meristemática; asterisco escuro=células diferenciadas; linha contínua=secção transversal A; linha pontilhada=secção transversal B; linha tracejada=secção transversal C; ~~arco~~ arco tracejado=surgimento das aurículas.

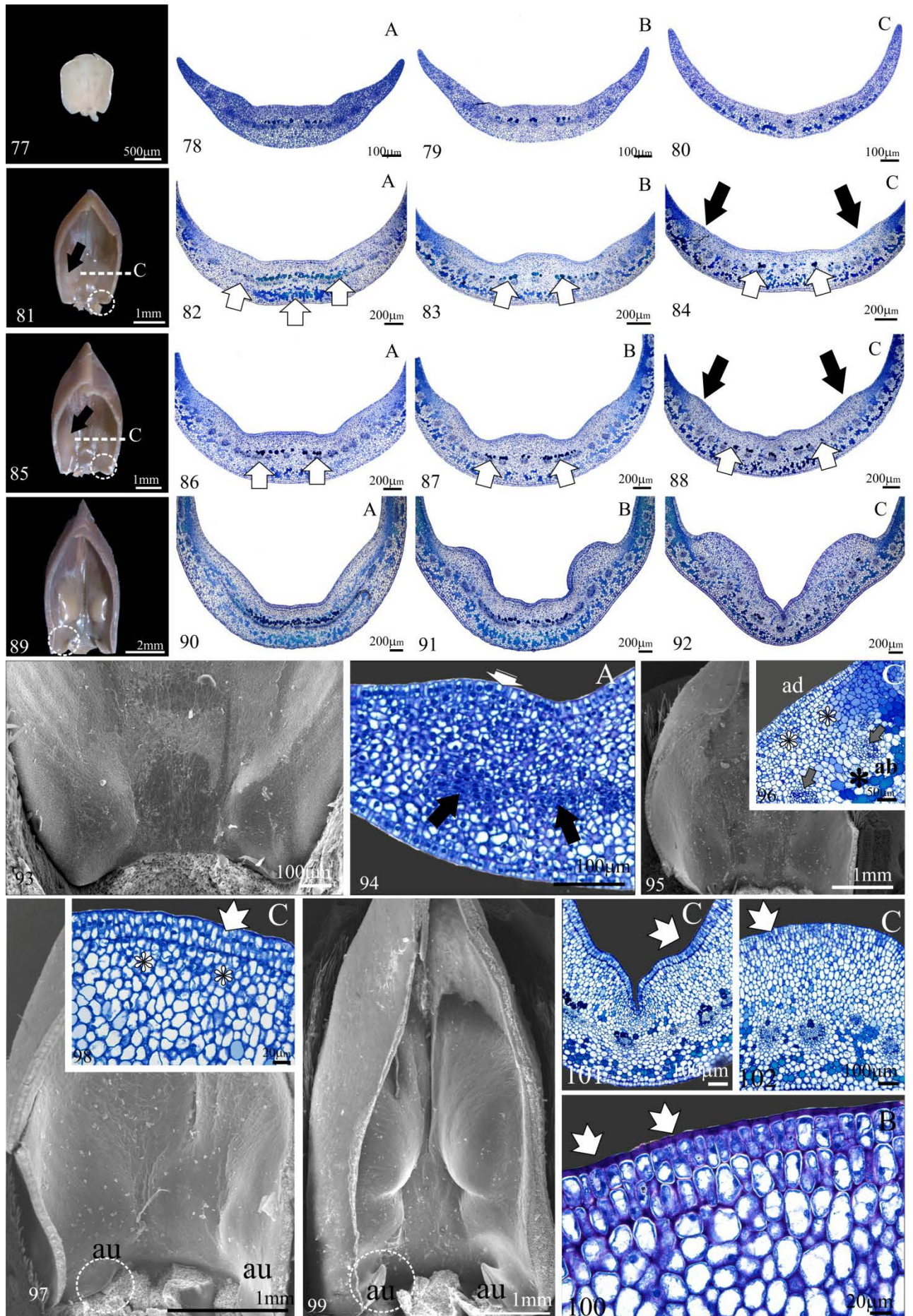




**Desenvolvimento do calo em *D. bicolor*** (Figs. 26-50). Pétala em microscopia óptica e sequencia de secções transversais na região basal da lâmina (A, B, C). Figs. 26-29, botão com 30mm; Figs. 30-33, botão com 60mm; Figs. 34-37, botão com 70mm; Figs. 38-41, botões com 90mm. Pétala em microscopia de varredura e detalhe das estruturas nos respectivos tamanhos de botão. Figs. 42-43, botão com 30mm; Figs. 44-46, botão com 60mm; Figs. 47-48, botão com 70mm; Figs. 49-50, botão com 90mm. ad= face adaxial, ab= face abaxial; au=aurículas; seta escura=procâmbio; seta cinza= feixes vasculares; seta branca com margem escura= idioblastos taniníferos; seta branca=epiderme unisseriada; seta branca com ponta dupla= epiderme plurisseriada; cabeça de seta branca=divisões anticlinais na protoderme uniestratificada; asterisco branco= região meristemática; asterisco escuro=células diferenciadas; linha contínua=secção transversal A; linha pontilhada=secção transversal B; linha tracejada=secção transversal C; círculo tracejado=surgimento das aurículas.



**Desenvolvimento do calo em *D. grandiflora*** (Figs. 51-76). Pétala em microscopia óptica e sequencia de secções transversais na região basal da lâmina (A, B, C). Figs. 51-54, botão com 30mm; Figs. 55-58, botão com 60mm; Figs. 59-62, botão com 70mm; Figs. 63-66, botões com 90mm. Pétala em microscopia de varredura e detalhe das estruturas nos respectivos tamanhos de botão. Figs. 67-68, botão com 30mm; Figs. 69-70, botão com 60mm; Figs. 71-73, botão com 70mm; Figs. 74-76, botão com 90mm. ad= face adaxial, ab= face abaxial; au=aurículas; seta escura=procâmbio; seta cinza= feixes vasculares; seta branca com margem escura= idioblastos taniníferos; seta branca=epiderme unisseriada; seta branca com ponta dupla= epiderme plurisseriada; cabeça de seta branca=divisões anticlinais na protoderme uniestratificada; asterisco branco= região meristemática; asterisco escuro=células diferenciadas; linha contínua=secção transversal A; linha pontilhada=secção transversal B; linha tracejada=secção transversal C; círculo tracejado=surgimento das aurículas.



**Desenvolvimento do calo em *D. sclerocarpa*** (Figs. 77- 102). Pétala em microscopia óptica e sequencia de secções transversais na região basal da lâmina (A, B, C). Figs. 77-80, botão com 30mm; Figs. 81-84, botão com 60mm; Figs. 85-88, botão com 70mm; Figs. 89-92, botões com 90mm. Pétala em microscopia de varredura e detalhe das estruturas nos respectivos tamanhos de botão. Figs. 93-94, botão com 30mm; Figs. 95-96, botão com 60mm; Figs. 97-98, botão com 70mm; Figs. 99-102, botão com 90mm. ad= face adaxial, ab= face abaxial; au=aurículas; seta escura=procâmbio; seta cinza= feixes vasculares; seta branca com margem escura= idioblastos taniníferos; seta branca=epiderme unisseriada; seta branca com ponta dupla= epiderme plurisseriada; cabeça de seta branca=divisões anticlinais na protoderme uniestratificada; asterisco branco= região meristemática; asterisco escuro=células diferenciadas; linha contínua=secção transversal A; linha pontilhada=secção transversal B; linha tracejada=secção transversal C; círculo tracejado=surgimento das aurículas.

## Discussão

Elaborações nas pétalas (como p.ex. calosidades), constituem um dos diferentes modos de especialização das flores papilionáceas (Tucker 2003) e a despeito da sua importância taxonômica tanto para a família Leguminosae (Maxwell 1969, Lackey 1981, Queiroz *et al.* 2003, Le Roux and Van Wyk 2012), quanto para outras famílias como Bromeliaceae, Rubiaceae e Compositae (Brown & Terry 1992, Vaes *et al.* 2006, Thomas *et al.* 2009) e de sua importância ecológica (Schrire 1989, Endress & Matthews 2006) até o presente momento poucos estudos que caracterizam o desenvolvimento de tais estruturas a partir da caracterização anatômica (Vaes *et al.* 2006, Thomas *et al.* 2009) correlacionam as informações obtidas com sistemas particulares de polinização.

Estruturas elaboradas nas flores papilionáceas como esculturações nas alas e calosidades na pétala estandarte constituem expressões especializadas da zigomorfia que se diferenciam tardiamente no desenvolvimento (Tucker 2003). No último estágio de desenvolvimento floral todos os órgãos florais já estão formados e elaborações, segundo Tucker (1997), começam a surgir como a fusão entre estames, a formação de fenestrações (dois orifícios na base do tubo formado pelos filetes), papilas estigmáticas, aurículas e características na epiderme de alguns órgãos como saliências ou sulcos nas pétalas, dentre outras. O calo na pétala estandarte das espécies de *Dioclea* analisadas inicia a sua expressão no último estágio de desenvolvimento referido por Tucker (1997), como o observado na ontogenia dos apêndices presentes em pétalas de Bromeliaceae (Brown & Terry 1992). Nas espécies de *Dioclea* estudadas, na flor em antese, as saliências formadas no início do desenvolvimento do calo resultam em um único morfotipo caracterizado por duas protuberâncias, do mesmo modo como descrito em muitos táxons de Phaseoleae (Phaseolinae) e Crotalarieae (Lackey 1981, Etcheverry *et al.* 2008, Le Roux and Van Wyk 2012). Em Bromeliaceae, ao contrário, da protuberância inicial resultam morfotipos diferentes, com padrões de desenvolvimento distintos (Brown & Terry 1992).

O resultados obtidos refutam as descrições taxonômicas que caracterizam *D. lasiophylla* como uma espécie desprovida de calo (Maxwell 1969, Queiroz *et al.* 2003).

As diferenças apontadas no desenvolvimento do calo nas espécies analisadas originaram estruturas calosas distintas: a inconspícua com poucas camadas de colênquima, epiderme do calo uniestratificada e localizada na base da pétala (*D. lasiophylla* - seção *Dioclea*), a conspícua com poucas camadas de colênquima, epiderme do calo pluriestratificada e localizada acima da base da pétala (*D. bicolor* - seção *Platylobium*) e a conspícua com mais de cinco camadas de colênquima,

epiderme na região do calo pluriestratificada e localizada acima da base da pétala. Tais diferenças ocorreram em estágios tardios do desenvolvimento floral e de acordo com Tucker (1997), teriam influência na separação de espécies, como observado no presente estudo para as espécies de *Dioclea* do mesmo modo como para as espécies e seções de Bromeliaceae (Brown & Terry 1992)

A diferenciação da epiderme plurisseriada nas espécies de *Dioclea* com calo conspícuo (*D. bicolor*, *D. grandiflora* e *D. sclerocarpa*) é semelhante ao desenvolvimento da mesma estrutura em diferentes órgãos vegetais, como folhas e raízes (Kaul 1977, Fahn 1990, Dickison 2000). As divisões celulares no plano periclinal ocorrem em estágios tardios do desenvolvimento, numa fase em que os demais tecidos já estão diferenciados. Esse padrão é observado em muitos táxons como, por exemplo, em certas espécies de Begoniaceae, Piperaceae e Chenopodiaceae (Fahn 1990) e nas Cyperaceae (Martins *et al.* 2012).

A complexidade do desenvolvimento do calo conspícuo resulta numa estrutura especializada tanto por suas características anatômicas, se comparadas com os apêndices de representantes de Bromeliaceae que são integrados basicamente por parênquima (Brown & Terry 1992), enquanto que nas espécies de *Dioclea* são integrados por colênquima, quanto por sua correlação com um determinado modo de polinização presente nas *Dioclea*, que é o executado por abelhas do gênero *Centris*. A formação do calo próximo a região mediana da lâmina da pétala, como encontrado também em espécies de *Crotalaria* - Leguminosae-Papilionoideae-Crotalarieae (Le Roux and Van Wyk 2012), com maior quantidade de camadas de colênquima e epiderme plurisseriada com paredes espessadas, produziu um local adequado na pétala para que as referidas abelhas possam fixar suas mandíbulas, posicionando-se de maneira mais estável nessas flores e garantindo não só que a flor seja menos danificada como uma polinização mais eficiente (Franco 1995). Entretanto dentro do calo conspícuo a espécie *D. bicolor* revelou poucas camadas de colênquima, se comparadas com as demais espécies, o que pode representar uma condição intermediária entre os tipos mais simples e mais complexos da estrutura e pode sugerir em plantas polinizadas pelos mesmos gêneros de abelhas, uma resposta imediata a variações particulares no modo de polinização (Westerkamp and Claßen-Bockhoff 2007).

As aurículas na base da pétala estandarte das flores de *Dioclea* constituem estruturas elaboradas assim como a estrutura calosa, entretanto surgem de maneira diferenciada e estão relacionadas com o aspecto inconspícuo e conspícuo do calo. Na espécie com calo inconspícuo surge na fase final do desenvolvimento do calo e nas espécies com calo conspícuo surge simultaneamente com o desenvolvimento do calo, sendo como nos apêndices de Bromeliaceae as

últimas estruturas multicelulares a serem formadas na flor (Brown & Terry 1992). Considerando a função dessas estruturas que é a de garantir a ocultação do néctar (Arroyo 1981) supõe-se que as mesmas apresentem maior correlação com a função primária da estrutura calosa conspícua que é a de constituir uma barreira ao acesso lateral ao recurso (Etcheverry *et al.* 2008) do que com a estrutura calosa inconspícua.

A complexidade no desenvolvimento do calo constitui mais um traço dentre muitos exemplos de ecotipo de polinização, definido por Peter and Johnson 2014 como uma forma floral adequada a um determinado polinizador particular. Dentre os exemplos de ecotipo de polinização, pode-se citar flores com comprimento variável do tubo floral e sua correspondência com variações na língua dos polinizadores ou mesmo variações intraespecíficas na química do odor floral associada com diferentes polinizadores (Peter and Johnson 2014). No presente trabalho, diferenças dentro do mesmo padrão de desenvolvimento produziram um calo conspícuo, com muitas camadas de colênquima e epiderme plurisseriada localizado na região mais próxima da porção mediana da pétala, tais características promoveram a especialização morfológica entre a pétala estandarte de algumas espécies de *Dioclea* (seção *Pachylobium*) com abelhas do gênero *Centris* Fabricius.



## Conclusão

No presente estudo as espécies de *Dioclea* analisadas apresentam calo na pétala estandarte com o mesmo morfotipo, ou seja, constituído por um par de protuberâncias situadas na face adaxial da pétala. O calo surge em estágios tardios do desenvolvimento da flor e apresenta a mesma origem, por divisões no meristema fundamental na face adaxial da lâmina produzindo ao final da diferenciação dois tipos de estruturas, uma mais simples restrita a porção basal da pétala e integrada por uma camada de colênquima e epiderme uniestratificada, encontrada na espécie com calo inconspícuo e outra mais complexa, próxima da porção mediana da pétala, integrada por mais camadas de colênquima e epiderme pluriestratificada e encontrada nas espécies com calo conspícuo. Tais estruturas configuram ecótipos de polinização distintos e são necessários mais estudos não só do desenvolvimento do calo em espécies *Dioclea* polinizadas por abelhas circunscritas em outras seções, como que espécies de abelhas polinizam efetivamente tais flores dessas espécies a fim de delimitar quais ecotipos de polinização são característicos no gênero.

## Referências

- Andrade, A.L.P., 2008. *A subfamília Faboideae (Fabaceae Lindl.) no Parque Estadual do Guatelá, Município de Tibagi, Estado do Paraná*. Dissertation, Federal University of Paraná, Brazil.
- Arroyo, M.T.K., 1981. Breeding systems and pollination biology in Leguminosae. In: R. M. Polhill & P. H. Raven (Eds.). *Advances in legume systematics*. Vol 2. Royal Botanic Gardens, Kew. pp. 723 – 767.
- Brown, G.K., Terry, R.G. 1992. Petal appendages in Bromeliaceae. *American journal of botany* 79 (9): 1051-1071
- Dickison, W.C., 2000. *Integrative plant anatomy*. Academic Press. California, EUA.
- Endress, P.K., Matthews, M.L., 2006. Elaborate petals and staminodes in eudicots: diversity, function and evolution. *Organisms, diversity & evolution* 6: 257-293.
- Etcheverry, A.V., Alemán, M.M., Fleming, T.F., 2008. Reproductive biology of *Vigna caracalla*. *Annals of botany* 102: 305-316.
- Fahn, A., 1990. *Plant Anatomy*. 4th. Pergamon Press.
- Franco, A.L.M., 1995. *Ecologia da polinização e biologia reprodutiva de sete espécies de Phaseoleae (Fabaceae)*. PhD Thesis. Universidade de Campinas, Brazil.
- Johansen, D.A., 1940. *Plant microtechnique*. New York, MacGraw-Hill Book Company, Inc
- Kaul, R.B., 1977. The role of the multiple epidermis in foliar succulence of *Peperomia* (Piperaceae). *Botanical Gazette*, 138 (2): 213-218.
- Lackey, J.A., 1981. Phaseoleae. In: Polhill RM, Raven PH, eds. *Advances in legume systematics*. Royal Botanic Gardens, Kew 1: 301-327.
- Le Roux, M.M., Van Wyk, B.E., 2012. The systematic value of flower structure in *Crotalaria* and related genera of the tribe Crotalarieae (Fabaceae). *Flora* 207: 414-426.
- Martins, S., Pilatti, V., Vegetti, A., Scatena, V.L., 2012. Do leaves in Cyperoideae (Cyperaceae) have a multiple epidermis or a hypodermis? *Flora* 207: 341-345.
- Maxwell, R.H., 1969. *The genus Dioclea (Fabaceae) in the new world*.1. PhD. Thesis. Southern Illinois University

- Maxwell, R.H., Taylor, D.W., 2003. Phylogenetic relationships of the Diocleinae with particular emphasis on the subgroups of *Dioclea*. In: Klitgaard BB, Bruneau A. eds. *Advances in legume systematics*. Higher Level Systematics, Royal Botanic Gardens, Kew 10: 325-353.
- O'Brien, T.P., McCully, M.E., 1981. The study of plant structure: principles and selected methods. Melbourne, Vic. Australia: Termarcarphi Pty. Ltd.
- Peter, C.I., Johnson, S.D., 2014. A pollinator shift explains floral divergence in an orchid species complex in South Africa. *Annals of Botany* 113: 277-288.
- Queiroz, L.P., 1999. Sistemática e filogenia do gênero *Camptosema* W.J. Hook. & Arn. (Leguminosae: Papilionoideae: Phaseoleae). PhD. Thesis. University of São Paulo, Brazil.
- Queiroz, L.P., Fortunato, R.H., Giuliatti, A.M., 2003. Phylogeny of the Diocleinae (Papilionoideae: Phaseoleae) based on morphological characters. In: Klitgaard BB, Bruneau A. eds. *Advances in legume systematics*. Higher Level Systematics, Royal Botanic Gardens, Kew 10: 303-324.
- Schrire, B.D., 1989. A multidisciplinary approach to pollination biology in the Leguminosae. Stirton CH, Zarucchi JL. eds. *Advances in legume biology*. Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden 29: 183-242.
- Thomas, M.M., Rudall, P.J., Ellis, A.G., Savolainen, V., Glover, B.J., 2009. Development of a complex floral trait: The pollinator-attracting petal spots of tge beetle daisy, *Gorteria diffusa* (Asteraceae). *American journal of botany* 96 (12):2184-2196.
- Tucker, S.C., 1997. Floral evolution, development and convergence: the hierarchical significance hypothesis. *International Journal of Plant Science* 158 (6 Suppl.): 143-161.
- Tucker, S.C., 2003. Floral ontogeny in *Swartzia* (Leguminosae: Papilionoideae: Swartzieae): distribution and role of the ring meristem. *American Journal of Botany* 90 (9): 1271–1292.
- Vaes, E., Vrijdaghs, A., Smets, E., Dessein, S., 2006. Elaborate petals in australian Spermaceoce (Rubiaceae) species: morphology, ontogeny and function. *Annals of botany* 98: 1167- 1178.
- Westerkamp, C., 1997. Keel blossoms: bee flowers with adaptations against bees. *Flora* 192: 125-132.
- Westerkamp, C., Claßen-Bockhoff, R., 2007. Bilabiate flowers: the ultimate response to bees? *Annals of botany* 100: 361-374.

## Conclusões gerais

Os dados anatômicos e ontogenéticos do presente estudo demonstram a presença do calo na pétala estandarte nas espécies de *Dioclea* analisadas. A estrutura calosa se apresenta sob um mesmo morfotipo representado por duas protuberâncias, assim como as formas mais comuns encontradas em alguns táxons dentro de Crotalariaeae e em Phaseolinae (Lackey 1981, Le Roux and Van Wyk 2012).

O calo de todas as espécies estudadas tem uma origem comum, proveniente de divisões no meristema fundamental voltado para a face adaxial no último estágio de desenvolvimento da flor definido por Tucker (1997), quando todos os órgãos se encontram formados.

Os caracteres morfológicos e anatômicos do calo apresentaram variações que permitiram separar as seções e as espécies estudadas, dentro das seções tradicionalmente circunscritas (Maxwell 1969). A seção *Pachylobium* foi separada das demais, principalmente pelos caracteres anatômicos do calo, como células epidérmicas poligonais alongadas, colênquima lacunar no mesofilo abaxial e de cinco a mais camadas de colênquima anelar no mesofilo do calo.

Os dados anatômicos e morfológicos combinados apontaram similaridades entre as seções *Pachylobium* e *Platylobium*, que possuem calo conspícuo localizado longitudinalmente na posição central e são separadas pela presença na seção *Platylobium* de células epidérmicas poligonais, colênquima anelar na superfície abaxial e menos de cinco camadas de colênquima no mesofilo adaxial. O calo inconspícuo encontrado apenas nas espécies da seção *Dioclea* caracteriza-se pela localização na posição basal, pela forma arredondada em vista frontal e pelo ângulo de abertura do canal obtuso com base arredondada.

As análises anatômicas associadas às análises estatísticas comprovaram o valor diagnóstico do calo e permitiram demonstrar a importância desse caráter para futuras análises filogenéticas.

Os caracteres anatômicos do calo conspícuo observado nas seções *Pachylobium* e *Platylobium*, como a presença de epiderme múltipla e colênquima conferem resistência estrutural que permite a polinização por abelhas *Centris* Fabricius . Tais similaridades indicam uma função ecológica do calo e um nível maior de especialização na seção *Pachylobium*.

O desenvolvimento do calo corrobora a hipótese de Tucker (1997) que refere que estruturas mais especializadas se desenvolvem mais tardiamente na ontogênese da flor. O estudo mostra que dentro do conceito de ecotipo de polinização (Peter and Johnson 2014) não só a morfologia como

o desenvolvimento de uma estrutura elaborada na pétala revelou-se especializada a um polinizador em particular.

## Referências bibliográficas

- Andrade, A. L. P. 2008. *A subfamília Faboideae (Fabaceae Lindl.) no Parque Estadual do Guatelá, Município de Tibagi, Estado do Paraná*. Dissertação de mestrado. 130 pp.
- Arroyo, M. T. K. 1981. Breeding systems and pollination biology in Leguminosae. In: R. M. Polhill & P. H. Raven (Eds.). *Advances in legume systematics*. Vol 2. Royal Botanic Gardens, Kew. pp. 723 – 767.
- Cronk, Q. and Ojeda, I. 2008. Bird-pollinated flowers in an evolutionary and molecular context. *Journal of experimental botany* 59 (4): 715-727.
- Endress, P. K. 1994. *Diversity and evolutionary biology of tropical flowers*. Cambridge University Press.
- Endress, P. K. & Matthews, M. L. 2006. Elaborate petals and staminodes in eudicots: diversity, function and evolution. *Organisms, diversity & evolution* 6: 257-293.
- Etcheverry, A. V., Alemán, M. M., Fleming, T. F. 2008. Reproductive biology of *Vignacarcalla*. *Annals of botany* 102: 305-316.
- Faegri, K. & van der Pijl, L. 1979. *The principles of pollination ecology*.(ed. 3). Oxford: Pergamon.
- Franco, A. L. M. 1995. *Ecologia da polinização e biologia reprodutiva de sete espécies de Phaseoleae (Fabaceae)*. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas.
- Lackey, J. A. 1981. Phaseoleae. In: R.M. Polhill & P. H. Raven (Eds.). *Advances in legume systematics*. Vol 1. Royal Botanic Gardens, Kew. pp.301-327.
- Leppik, E. E. 1966. Floral evolution and pollination in the Leguminosae. *Annales Botanici Fennici* 3: 299-308.
- Le Roux, M. M., Van Wyk, B. E. 2012. The systematic value of flower structure in *Crotalaria* and related genera of the tribe Crotalarieae (Fabaceae). *Flora* 207: 414-426.
- Maxwell, R. H. 1969. *The genus Dioclea (Fabaceae) in the new world*. Vol. 1. Phd. Thesis
- \_\_\_\_\_. 1980. *Dioclea*. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 67: 662-675.
- \_\_\_\_\_. & Taylor, D. W. 2003. Phylogenetic relationships of the Diocleinae with particular emphasis on the subgroups of *Dioclea*. In: B.B. Klitgaard and A. Bruneau (editors). *Advances*

- in Legume Systematics, part 10, Higher Level Systematics, pp. 325-353. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Ojeda, I., Francisco-Ortega, J., Cronk, Q. C. B. 2009. Evolution of petal epidermal micromorphology in Leguminosae and its use as a marker of petal identity. *Annals of Botany* 104: 1099-1110.
- Pennington, R.T., Klitgaard, B.B., Ireland, H., Lavin, M. 2000. New insights into floral evolution of basal papilionoideae from molecular phylogenies. In: P.S. Herendeen and A. Bruneau (Eds.). *Advances in legume systematics*. Vol 9. Royal Botanic Gardens, Kew. pp. 233– 248.
- Peter, C.I., Johnson, S.D., 2014. A pollinator shift explains floral divergence in an orchid species complex in South Africa. *Annals of Botany* 113: 277-288.
- Polhill, R.M. 1981. Papilionoideae. In: R.M. Polhill & P. H. Raven (Eds.). *Advances in legume systematics*. Vol 1. Royal Botanic Gardens, Kew. pp. 191-205.
- Polhill, R.M., Raven, P. H., Stirton, C. H. 1981. Evolution and systematics of the Leguminosae. In: R.M. Polhill & P. H. Raven (Eds.). *Advances in legume systematics*. Vol 1. Royal Botanic Gardens, Kew. pp. 1-26.
- \_\_\_\_\_. 1976. Genisteae (Adans.) Benth. and related tribes (Leguminosae). *Botanic Systematic* 1: 143-368.
- Prenner, G. 2004. New aspects in floral development of Papilionoideae: Initiated but suppressed bracteoles and variable initiation of sepals. *Annals of Botany* 93: 537-545.
- Proctor, M., Yeo, P., Lack, A. 1996. The diversity of insect-pollinated flowers. 6: 143-185. In: *The natural history of pollination*. Timber Press Portland, Oregon.
- Queiroz, L. P. 1998. A new cauliflorous species of *Dioclea* Kunth. (Leguminosae: Phaseoleae) from southeastern Brazil. *Novon* 8: 433-435.
- \_\_\_\_\_. 1999. *Sistemática e filogenia do gênero Camptosema* W. J. Hook. & Arn. (Leguminosae: Papilionoideae: Phaseoleae). Tese (doutorado). Universidade de São Paulo.
- \_\_\_\_\_. Fortunato, R.H., Giulietti, A.M. 2003. Phylogeny of the Diocleinae (Papilionoideae: Phaseoleae) based on morphological characters. In: B.B. Klitgaard and A. Bruneau (editors). *Advances in Legume Systematics, part 10, Higher Level Systematics*, pp. 303-324. Royal Botanic Gardens, Kew.
- \_\_\_\_\_. 2009. *Leguminosas da caatinga*. Universidade Estadual de Feira de Santana. 467

pp. il.

- \_\_\_\_\_. 2012. *Dioclea*. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB022941>).
- Schrire, B. D. 1989. A multidisciplinary approach to pollination biology in the Leguminosae. In: C. H. Stirton & J. L. Zarucchi (Eds.). *Advances in legume biology*. Missouri Botanical Garden. 29: 183-242.
- \_\_\_\_\_, Lewis, G. P., Lavin, M. 2005. Biogeography of the Leguminosae. Pp. 21-54. In G. P. Lewis, B. D. Schrire, B. Mackinder & J. M. Lock (eds.). *Legumes of the world*. Royal Botanic Gardens, Kew, England.
- Stirton, C. H. 1981. Petal sculpturing in papilionoide legumes. *Advances in legume systematic*, eds. R. M. Polhill & P. H. Raven. 771-788.
- Tucker, S. C. 1997. Floral evolution, development and convergence: the hierarchical-significance hypothesis. *Journal Plant. Sciences*. 158(6), supplement, 143-161.
- Vaes, E. Vrijdaghs, A., Smets, E. F., Dessein, S. 2006. Elaborate petals in australian *Spermacoce* (Rubiaceae) species: morphology, ontogeny and function. *Annals of botany* 98: 1167- 1178.
- Varela, E. S., Lima, J. P. M. S., Galdino, A. S., Pinto, L. S., Bezerra, W. M., Nunes, E. P., Alves, M. A. O., Grangeiro, T. B. 2004. Relationships in subtribe Diocleinae (Leguminosae; Papilionoideae) inferred from internal transcribed spacer sequences from nuclear ribosomal DNA. *Phytochemistry*. 65: 59–69.
- Westerkamp, C. 1997. Keel blossoms: bee flowers with adaptations against bees. *Flora* 192: 125-132.
- Westerkamp, C. and Paul, H. 1993. *Apios americana*, a fly-pollinated papilionaceous flower? *Plant systematics and evolution* 187: 135-144.
- Westerkamp, C., Weber, A. 1999. Keel flowers of the Polygalaceae and Fabaceae: a functional comparison. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 129: 207-221.
- Whitney, H. M. and Glover, B. J. 2007. Morphology and development of floral features recognized by pollinators. *Anthropod-Plant Interactions* 1: 147-158.