



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



COMO DUAS ESPÉCIES DE *CHAMAECRISTA* LIDAM COM O DILEMA DO PÓLEN? DIFERENÇA NO TAMANHO FLORAL E NA ESTRATÉGIA REPRODUTIVA MEDIADA PELAS ABELHAS

TAMIRIS DAIANE DELGADO DE LIMA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas Botânica, Área de concentração Ecologia Vegetal.

Botucatu – SP

2019

Instituto de Biociências, UNESP, Campus de Botucatu Seção Técnica de Pós-Graduação Rua Professor Doutor Antonio Celso Wagner Zanin, s/nº, Botucatu, SP – CEP 18618-689 Telefone (14) 3880-0780
posgraduacao@ibb.unesp.br



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

COMO DUAS ESPÉCIES DE *CHAMAECRISTA* LIDAM COM O
DILEMA DO PÓLEN? DIFERENÇA NO TAMANHO FLORAL E
NA ESTRATÉGIA REPRODUTIVA MEDIADA PELAS ABELHAS

TAMIRIS DAIANE DELGADO DE LIMA
DR. ANSELMO NOGUEIRA

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências, Campus de Botucatu,
UNESP, para obtenção do título de
Mestre no Programa de Pós-
Graduação em Ciências Biológicas
Botânica, Área de concentração
Ecologia Vegetal.

Botucatu – SP
2019

Instituto de Biociências, UNESP, Campus de Botucatu Seção Técnica de Pós-Graduação Rua Professor Doutor
Antonio Celso Wagner Zanin, s/nº, Botucatu, SP – CEP 18618-689 Telefone (14) 3880-0780
posgraduacao@ibb.unesp.br

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Lima, Tamiris Daiane Delgado de.

Como duas espécies de *Chamaecrista* lidam com o dilema do pólen? Diferença no tamanho floral e na estratégia reprodutiva mediada pelas abelhas / Tamiris Daiane Delgado de Lima. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Anselmo Nogueira
Capes: 20306008

1. Divisão do trabalho. 2. Abelha - Pólen. 3. Polinização. 4. Antera. 5. Morfologia (Biologia).

Palavras-chave: Heteranteria; Dilema do pólen; Divisão de trabalho; Hercogamia; Tamanho floral.

Agradecimentos

A CAPES pela bolsa concedida.

A Deus, que foi minha maior força nos momentos difíceis. Sem ele, nada disso seria possível. Obrigada, senhor, a confiança e amor que tenho em ti me fortalece todos os dias.

Ao meu orientador Anselmo Nogueira pelo apoio, confiança e pelo empenho dedicado à elaboração deste trabalho.

Aos meus pais Dilma Lima e Waldir Lima, obrigada pelo amor incondicional e pelo exemplo de vida, pelo apoio, por confiar em mim, por não medirem esforços para que eu realize o meu sonho e por sempre ter palavras de incentivo.

As minhas irmãs Patty Lima e a Alecsandra Ferreira, que me ajudaram inúmeras vezes e cuidaram de mim.

Aos anjos em forma humana Patrick, Koba, Paty Joaquim, Maira, Lucas, Carol e a todos os anjos que fazem parte da Coexiste e estão aqui para nos lembrar o quantos somos amando por Deus, e pelos inúmeros abraços. Em especial meu agradecimento Kaw Yin Yan Yin por estarem disposto a ensinar o amor e o cuidado com outro e a nós mesmo, com tanto amor e dedicação.

Aos meus amigos de laboratório, Isabele, Milena, Felipe, Gabriel, Luana e a Natália em especial ao Guilherme meu companheiro de campo, que fizeram parte da minha formação e que vão continuar presentes em minha vida com certeza.

A os todos integrantes do programa, professores e funcionários pelo apoio em diversos instantes.

Obrigada!

Sumário

Resumo	2
Abstract	3
1. Introdução.....	4
2. Material e Método	7
2.1. Espécies focais e áreas de estudo	7
2.2. Morfologia floral de <i>C. desvauxii</i> var. <i>latistipula</i> e <i>C. nictitans</i>	8
2.3. Contagem dos grãos de pólen e dos óvulos das flores de <i>C. desvauxii</i> var. <i>latistipula</i> e <i>C. nictitans</i>	9
2.4. Padrão de visitação de espécies de abelhas em flores de <i>C. desvauxii</i> var. <i>latistipula</i> e <i>C. nictitans</i>	10
2.5. Teste da hipótese de divisão de trabalho entre morfos de estames nas duas espécies de <i>Chamaecrista</i>	10
2.6. Avaliando o papel da autopolinização mediada pelas abelhas em flores de <i>C. desvauxii</i> var. <i>latistipula</i> e <i>C. nictitans</i>	11
2.7. Teste de autocompatibilidade em flores de <i>C. desvauxii</i> var. <i>latistipula</i> e <i>C. nictitans</i>	12
2.8. Análises de dados	13
3. Resultado	14
3.1. Como a diferença no tamanho floral modifica a morfologia das flores, o grau de hercogamia e heteranteria nas duas espécies de <i>Chamaecrista</i> ?.....	14
3.2. A diferença no tamanho das flores está correlacionada com mudanças na produção relativa de grãos de pólen e óvulos?.....	17
3.3. As diferenças no tamanho floral e disponibilidade de recursos geram mudanças na assembleia de polinizadores e antagonistas?	18
3.4. Existe divisão de trabalho entre os morfos das anteras nas flores pequenas de <i>C. nictitans</i> e flores maiores de <i>C. desvauxii</i> var. <i>latistipula</i> ?.....	21
3.5. Flores pequenas de <i>C. nictitans</i> favorecem uma maior taxa de autopolinização em relação as flores maiores de <i>C. desvauxii</i> var. <i>latistipula</i> ?	22
4. Discussão	24
5. Conclusão e Perspectivas Futuras.....	28

6. Referências Bibliográficas.....	29
Figuras	35

LIMA, T. D. D. AS COMO DUAS ESPÉCIES DE *CHAMAECRISTA* LIDAM COM O DILEMA DO PÓLEN? DIFERENÇA NO TAMANHO FLORAL E ESTRATÉGIA REPRODUTIVA MEDIADA PELAS ABELHAS, 2019. 35p. DISSERTAÇÃO (MESTRADO) – INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”, BOTUCATU.

Resumo: A variação no tamanho floral entre espécies vegetais interfere diretamente no grau de heteranteria e grau hercogamia dentro da flor, e pode favorecer a divisão de trabalho entre as anteras, diminuindo o conflito por pólen entre planta e polinizador. Neste trabalho, nosso objetivo principal é investigar como o tamanho floral modifica o processo de polinização e estratégia reprodutiva em duas espécies com tamanhos florais contrastantes: *Chamaecrista desvauxii* var. *latistipula* e *Chamaecrista nictitans*. Nossa hipótese é de que a morfologia das flores maiores de *C. desvauxii* var. *latistipula* com androceu evidentemente heteromórfico favoreça a divisão de trabalho, e a segurança reprodutiva nessas flores ocorra via anteras de polinização; enquanto que a morfologia das flores menores de *Chamaecrista nictitans* não favorece a divisão de trabalho entre as anteras e que a segurança reprodutiva e o conflito por pólen sejam superados pelo predomínio da autopolinização. Nossos resultados indicam que não ocorre divisão de trabalho entre os conjuntos das anteras em ambas as espécies, embora a heteranteria seja visível em *C. desvauxii*. Independente do tamanho das flores os diferentes conjuntos de anteras não diferem em atração visual para as abelhas. Já em flores menores de *C. nictitans* nossos resultados indicam a quebra da heteranteria e da hercogamia em um sistema mais generalista quando comparado a flores maiores de *C. desvauxii* var. *latistipula*. As flores pequenas de *C. nictitans* dependem do auto pólen para alcançar o sucesso reprodutivo, o mesmo não ocorre com as flores grandes de *C. desvauxii*. A preponderância da autopolinização mediada pelas abelhas ou por autopolinização espontânea é evidente nas flores menores, diferente das flores de *C. desvauxii* muito mais dependente da visita das abelhas.

Palavras chaves: Divisão de trabalho, heteranteria, hercogamia, autopolinização, dilema do pólen, tamanho floral, polinização por vibração.

LIMA, T. D. D. AS TWO SPECIES OF *CHAMAECRISTA* DEAL WITH THE DILEMMA OF THE POLLEN? DIFFERENCE IN FLORAL SIZE AND REPRODUCTIVE STRATEGY MEDIATED BY BEES, 2019. 35p. MASTER THESIS (MASTER) – INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”, BOTUCATU.

Abstract: The variation in floral size between plant species directly interferes with the degree of heteranthery and degree of herkogamy within the flower and may favor the division of labor between the anthers, reducing the conflict between plant pollen and pollinator. In this work, our primary objective is to investigate how the floral size modifies the pollination process and reproductive strategy in two species with contrasting floral sizes: *Chamaecrista desvauxii* var. *latistipula* and *Chamaecrista nictitans*. We hypothesize that the morphology of the larger flowers of *C. desvauxii* with evident anther dimorphism favors the division of labor, and reproductive security in these flowers occurs via pollination anthers. Alternatively, the morphology of the smaller flowers of *C. nictitans* does not favor the division of labor between the anthers and that reproductive security and pollen conflict are overcome by the predominance of self-pollination. Our results indicate that there is no division of labor between the anther sets in both species, although heteranthery is visible in *C. desvauxii*. Regardless of the size of the flowers, the different anther sets do not differ in visual attraction for the bees. In smaller flowers of *C. nictitans*, our results indicate the breakage of heteranthery and herkogamy into a more general system when compared to larger flowers of *C. desvauxii*. The small flowers of *C. nictitans* depend on auto pollen to achieve reproductive success, the same does not occur with the large flowers of *C. desvauxii*. The preponderance of self-pollination by bees or spontaneous self-pollination is evident in the smaller flowers, different from the flowers of *C. desvauxii*, which is much more dependent on the visit of the bees.

Keywords: Division of labor, heteranthery, herkogamy, self-pollination, pollen dilemma, floral size, vibration pollination.

1. Introdução

A maior parte das plantas com flores depende dos animais para que ocorra a polinização. A interação planta-polinizador envolve muitas espécies de polinizadores por espécie vegetal e vice-versa (Waser et al., 1996; Morgan 2006). A relação entre flor e visitante é mediada por recursos florais, que atraem os animais, e acaba favorecendo a transferência do pólen (Varassin & Amaral-Neto, 2014). Os recursos florais tendem a saciar as necessidades fisiológicas do polinizador como a alimentação, reprodução e na construção de ninhos, e conseqüentemente o polinizador presta serviço transferência do gameta masculino (Agostini et al. 2014). A forma com que os recursos estão alocados na flor interfere diretamente no comportamento do animal durante a visita e determina o acesso ao recurso (Solís-Montero & Vallejo-Marín, 2017). Desta maneira, a morfologia floral, pode limitar no acesso ao recurso floral, garantindo que o visitante realize várias visitas e obtenha o mínimo de recurso, aumentando o número de visitas e chances de ocorrer a fertilização dos óvulos. Em contraponto, o visitante tenta coletar o máximo de recurso em uma única visita, otimizando o forrageio com o mínimo de esforços (Agostini et al. 2014).

Entre os grupos de polinizadores, as abelhas, são um grupo diverso e numeroso, e dependem dos recursos florais para sua sobrevivência (Michener, 2007). A dependência das abelhas por recurso florais e a das plantas pelo serviço de polinização, propiciou a evolução de adaptações da morfologia e do comportamento das abelhas para acesso dos recursos florais, e adaptações nas peças florais e do próprio recurso para atração dos visitantes (Pinheiro *et al*, 2014). A polinização por vibração é um exemplo de adaptação do comportamento da abelha para coleta do pólen, e da morfologia floral para a proteção dos grãos de pólen (Buchmann, 1983; De Luca & Vallejo-Marín, 2013). Cerca de 6 a 8% das espécies vegetais são polinizadas pela vibração das abelhas, que são caracterizadas por terem anteras poricidas, ausência ou baixa quantidade de néctar, sendo o pólen a principal recompensa oferecida às abelhas (Buchmann, 1983, Vallejo-Marin et al., 2010). Para que as abelhas colem o pólen, elas precisam agarrar uma ou mais anteras e transmitir as contrações musculares do tórax, o que faz com que os grãos de pólen dentro das anteras sejam liberados pelo poro para o corpo da abelha, em regiões como abdome e tórax (Michener, 1962; Buchmann, 1983; Hrncir et al., 2008). A liberação do pólen acaba, por sua vez, sendo dependente do grupo de abelhas que consegue realizar a vibração das anteras (Vallejo-Marín, 2018). As flores que ofertam pólen como o único recurso foram chamadas de flores de pólen (Vogel 1978), e acabam enfrentando um conflito maior quando comparadas que as plantas que ofertam pólen e néctar. Pois neste caso o pólen é o recurso que atrai as abelhas, e abriga o gameta masculino, responsável pela reprodução (Vallejo-Marín et

al. 2009; De Luca & Vallejo-Marín 2013). Se o pólen é excessivamente consumido pelas abelhas, o número de gametas masculinos disponíveis para a fertilização dos óvulos torna-se limitado, gerando um conflito para a planta, que é conhecido como “dilema do pólen” (Luo et al. 2009; Lunau et al. 2014).

Acredita-se que este conflito tenha levado à evolução de mecanismos para restringir a coleta de pólen (Lunau, et al. 2015). Uma possível estratégia é a produção de dois ou mais morfos diferentes de estames (heteranteria), que diferem quanto à forma, posição, tamanho e/ou cor. Os estames diferentes poderiam reduzir o conflito por pólen por permitir funções distintas para cada conjunto de estames (Luo et al. 2008; Vallejo-Marín et al. 2009). Müller (1883) propôs a hipótese de divisão de trabalho, no qual estames diferentes desempenham funções diferentes durante a visita das abelhas. O conjunto de estames com anteras menores e centrais na flor, com cores mais vibrantes, seriam “anteras de alimentação”, atraindo e disponibilizando pólen aos visitantes florais. O segundo conjunto, com anteras maiores deslocadas do centro da flor, muitas vezes com uma coloração opaca, diferente das demais seriam as “anteras de polinização” menos exploradas pelas abelhas, e direcionariam a deposição de pólen em sítios estratégicos no corpo dos polinizadores, favorecendo a reprodução sexuada dessas espécies vegetais (Müller, 1883; Agostini et al., 2014; Vallejo-Marín et al., 2014). Desta forma, haveria uma segurança reprodutiva para as plantas, já que o pólen não seria completamente explorado pelas abelhas como recurso alimentar para as larvas (Westerkamp 1996).

A variação no tamanho floral entre espécies vegetais interfere diretamente no grau de heteranteria e grau de separação espacial antera-estigma (hercogamia), e pode favorecer a divisão de trabalho entre as anteras dentro da flor, diminuindo o conflito por pólen entre planta e polinizador (Jesson & Barret 2003; Luo et al. 2008; Vallejo-Marín et al. 2014). Flores de pólen maiores têm maior espaço interno o que facilita divisão de trabalho entre anteras, podendo existir alto grau de heteranteria e hercogamia. Existem diversos exemplos da separação entre os conjuntos de anteras em diferentes linhagens de plantas, especialmente em Solanaceae, Melastomataceae e Fabaceae, no qual anteras menores estão mais ao centro da flor, enquanto que as anteras maiores estão mais marginais (Vallejo-Marín et al. 2014, Solís-Montero & Vallejo-Marín, 2017; Müller 1883). Assim, o polinizador chega para coletar o pólen das anteras de alimentação e ao vibrar o conjunto de anteras, as anteras de polinização depositam pólen em sítios seguros no corpo do polinizados (Solís-Montero & Vallejo-Marín, 2017; Müller 1883). Já em flores pequenas, o espaço dentro da flor é reduzido, o que dificultaria a divisão de trabalho entre o conjunto de estames, devido a redução ou a quebra da heteranteria (Vallejo-Marín et al. 2014). Neste caso, as anteras estão mais próximas entre si e da região estigmática, e a

segurança reprodutiva pode ser garantida pela preponderância da autofertilização dentro da própria flor (Vallejo-Marín et al. 2014).

Em um estudo realizado com espécies do gênero *Solanum* (Solanaceae) que possuem flores de pólen de diferentes tamanhos, os autores relacionam a diminuição do tamanho floral com a redução ou a quebra da separação espacial entre os órgãos reprodutivos antera-estigma, e também a diminuição da diferença entre anteras (heteranteria), da alocação de recursos e da relação pólen/óvulo (Vallejo-Marín et al. 2014). Flores maiores alcançariam o sucesso na polinização devido a existência de divisão de trabalho entre os morfos das anteras, o que diminuiria o conflito com as abelhas explorando os grãos de pólen como recurso. De maneira distinta, a redução do tamanho floral levaria a um aumento na taxa de autofertilização frente a fertilização cruzada pela diminuição da separação espacial antera-estigma (Vallejo-Marín et al. 2014). Embora os autores tenham criado expectativas claras sobre o funcionamento das flores com diferentes tamanhos e morfologias, e as estratégias alternativas das flores de pólen para lidar com o dilema do pólen, não existem evidências empíricas diretas contrastando o funcionamento das flores de pólen com diferentes tamanhos e seus visitantes florais. Neste trabalho, nosso objetivo principal é investigar como o tamanho floral modifica o processo de polinização e estratégia reprodutiva em duas espécies do gênero *Chamaecrista* Moench (Fabaceae) polinizadas por vibração. Para tanto, selecionamos duas espécies proximamente relacionadas com tamanhos florais contrastantes: *Chamaecrista desvauxii* var. *latistipula* (Benth.) G.P.Lewis e *Chamaecrista nictitans* (L.) Moench. Nossa hipótese é de que a morfologia das flores maiores de *C. desvauxii* com androceu evidentemente heteromórfico favoreça a divisão de trabalho, e que a segurança reprodutiva nessas flores ocorra via anteras de polinização; enquanto que a morfologia das flores menores de *Chamaecrista nictitans* não favoreça a divisão de trabalho entre as anteras e que a segurança reprodutiva e o dilema do pólen sejam superados pelo predomínio da autopolinização. Dessa forma, nós procuramos responder as seguintes perguntas específicas: (i) Como a diferença no tamanho floral modifica a morfologia das flores, o grau de hercogamia e heteranteria nas duas espécies de *Chamaecrista*? (ii) A diferença no tamanho das flores está correlacionada com mudanças na produção relativa de grãos de pólen e óvulos? (iii) As diferenças no tamanho floral e disponibilidade de recursos geram mudanças na assembleia de polinizadores e antagonistas? (iv) Existe divisão de trabalho entre os morfos das anteras nas flores pequenas de *C. nictitans* e flores maiores de *C. desvauxii* var. *latistipula*? (v) Flores pequenas de *C. nictitans* favorecem a autopolinização em relação as flores maiores de *C. desvauxii* var. *latistipula*?

2. Material e Método

2.1. Espécies focais e área de estudo

O gênero *Chamaecrista* Moench (*Caesalpinioideae* - Fabaceae) tem aproximadamente 330 espécies (Lewis, 2005). O Brasil é considerado o centro de diversificação do gênero com 256 espécies, sendo 207 dessas endêmicas (Souza & Bortoluzzi 2015). As espécies do gênero variam entre árvores, arbustos, subarbustos e ervas, que podem ser anuais, bianuais ou perenes. São caracterizadas por ter em folhas compostas, alternadas, paripinadas, com nectários extraflorais. Apresentam racemos com uma a muitas flores, 5 sépalas; 5 pétalas, amarelas, androceu 5-10 estames férteis, anteras poricidas; ovário súpero, unicarpelar (Queiroz & Loiola, 2009).

As flores de espécies do gênero *Chamaecrista* são polinizadas por abelhas que vibram as anteras poricidas para a liberação dos grãos de pólen, e existe grande variação no tamanho floral entre espécies (Queiroz & Loiola, 2009; Dantas & Silva, 2013). Nessas plantas, os grãos de pólen são os únicos recursos disponíveis para a atração das abelhas. Foram utilizadas como espécies focais neste estudo *Chamaecrista desvauxii* var. *latistipula* e *C. nictitans*. *Chamaecrista desvauxii* var. *latistipula* possui flores com cerca de 2 cm de diâmetro, enquanto *C. nictitans* possui flores menores com cerca de 0,5 cm de diâmetro.

O estudo foi conduzido no município de São Bernardo do Campo/SP, em uma área em que transplantamos 60 plantas (Figura 1), sendo 30 indivíduos de *Chamaecrista desvauxii* var. *latistipula*, e 30 de *C. nictitans*. As plantas de *C. nictitans* foram transplantadas de uma população natural que ocorre dentro do campus da Universidade Federal do ABC (UFABC), e *C. desvauxii* var. *latistipula* vieram de uma população natural que ocorre na margem da Represa da Cantareira. Ambas espécies são comumente encontradas juntas em diferentes áreas dentro do estado de São Paulo. Utilizamos como critério para o transplante a presença de com botões florais, indicando que as plantas já estavam reprodutivas. Os indivíduos foram transplantados para vasos (11L para *C. nictitans* e 18L para *C. desvauxii* var. *latistipula*); e a remoção das plantas em campo de ambas espécies ocorreu no mês de dezembro em plena estação chuvosa para favorecer o sucesso dos transplantes dos indivíduos. Para cada planta transplantada o solo adjacente a inserção do caule no solo (20 x 20 x 30 cm) foi removido junto com o sistema radicular e transferido para cada vaso. Para completar o solo casa vaso, um substrato composto por 40% de terra vegetal (Terra vegetal para plantação de gramas, flores, hortaliças e plantas em geral – ABC Garden; 19,8kg) e 60 % de areia lavada fina.

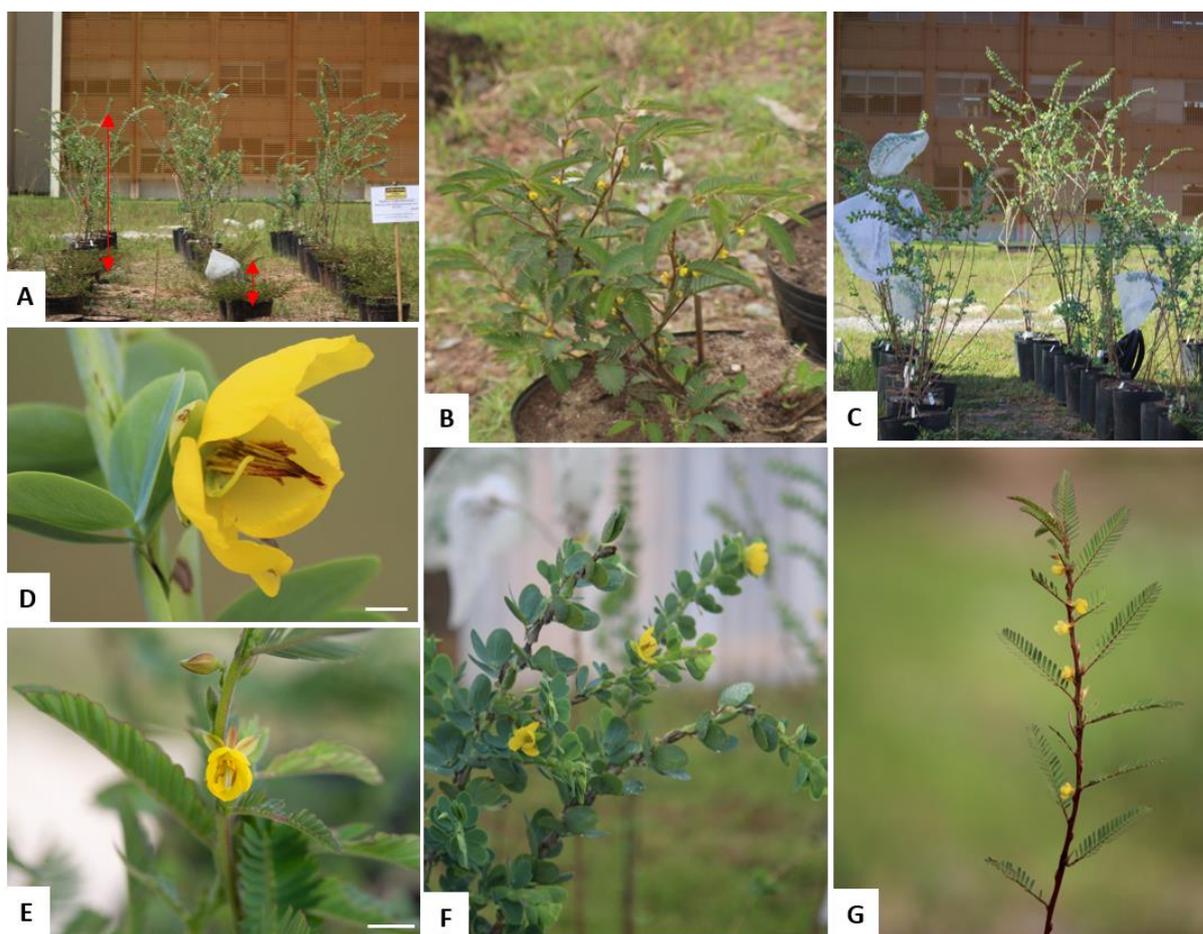


Figura 1: População de *Chamaecrista desvauxii* var. *latistipula* (Benth.) G.P.Lewis e *Chamaecrista nictitans* (L.) Moench. (Leguminosae) cultivadas dentro do campus da Universidade Federal do ABC (UFABC). (a) Área ocupada pelas plantas; em vermelho está à altura das plantas com até 2 m de *C. desvauxii* e 0.3 m de *C. nictitans*, (b) indivíduo de *C. nictitans* (c) indivíduos de *C. desvauxii*, (d) flor de *C. desvauxii*, (e) flor de *C. nictitans*. (f) ramos com flores e folhas em destaque de *C. desvauxii*, e (g) ramos com flores e folhas em destaque de *C. nictitans*. Escala 0,5 cm figura (d,e).

2.2. Morfologia floral de *C. desvauxii* var. *latistipula* e *C. nictitans*

Para caracterizar a variação na morfologia floral entre as duas espécies, amostramos 20 flores virgens de 15 indivíduos de cada espécie. As flores amostradas foram previamente ensacadas antes da antese. Após a abertura, as flores foram coletadas e armazenadas em um recipiente com papel filtro umedecido e mantida em temperatura ambiente a fim de evitar desidratação das estruturas florais. Em seguida, o recipiente foi mantido refrigerado, enquanto as flores eram dissecadas. A dissecação do material foi feita em lupa e as fotografias obtidas com escalas a partir de uma câmera embutida à lupa (Modelo – ZEISS SteREO Discovery V8). Foi utilizada massa de modelar para dar suporte à flor em todas as etapas da dissecação do material. Para a padronização das fotografias, a primeira fotografia foi tomada com a flor

intacta. Subsequentemente, as pétalas foram retiradas ou dobradas na base, com exceção da pétala maior que foi fotografada frontalmente e lateralmente. Em seguida, foi retirada, para melhor observação do androceu e gineceu. Os estames foram fotografados frontalmente e lateralmente, assim como o gineceu. O estigma foi fotografado com o maior aumento. Para a tomada de medidas morfométricas, nós utilizamos o processador de imagens ImageJ 1.8.0. Para cada flor, obtivemos as seguintes medidas: comprimento máximo da sépala mais externa; distância do poro da antera mais próxima do estigma; distância entre o poro da antera mais distante da estigma; comprimento individual de todos os estames (antera mais filete); diâmetro e espessura dos poros das anteras e diâmetro do estigma (em flores virgens, e em flores visitadas). O grau de heteranteria foi obtido calculando o erro padrão descrevendo a variação do comprimento das anteras dentro de cada flor.

Para o melhor detalhamento da área do estigma, do poro das anteras e dos grãos de pólen utilizamos um microscópio eletrônico de varredura (MEV FEI Quanta 250). Inicialmente as flores foram fixadas em uma solução de FAA 50 % (formalina, ácido acético e álcool etílico 50%) durante 24 horas e lavadas três vezes em álcool 70 %. Em seguida, as flores foram desidratadas em série alcoólica, 15 minutos em cada concentração de álcool (80%, 90%) e álcool absoluto (Synth), permanecendo ao final em álcool etílico absoluto por 24 horas. As amostras foram então secas com CO₂ no Ponto Crítico (Leica CPD300) preservando a integridade de amostras, e montadas em uma base de alumínio (*stubs*) com o auxílio de um microscópio estereoscópico (LABORMED – Luxeo 4Z). Finalmente as amostras foram metalizadas com ouro no Sputtering (Leica EM ACE 200) com uma cobertura de 16 µm.

2.3. Contagem dos grãos de pólen e dos óvulos das flores de *C. desvauxii* var. *latistipula* e *C. nictitans*

Para a contagens do número de grãos de pólen e óvulos selecionamos 10 plantas distintas de cada espécie de *Chamaecrista*. Em *C. desvauxii*, selecionamos um botão floral por planta para ambas as contagens de grãos de pólen e óvulos. Já em *C. nictitans* selecionamos 10 botões florais por planta dado que a quantidade de grãos de pólen por flor nessa espécie é muito pequena e não foi possível realizar as contagens de grãos de pólen em flores individuais.

Os botões em pré antese de ambas espécies foram fixados FAA 50 % (formalina, ácido acético e álcool etílico 50%) durante 24 horas, e em seguida dissecados para a separação do androceu. O androceu de uma única flor de *C. desvauxii* ou de dez flores em *C. nictitans* foram colocados em um eppendorf de 2ml de volume e adicionamos 600 µl de água destilada com Tweenn20 (concentração Tweenn20, 5µ para 600 ml de água destilada). Adicionamos ainda

uma microesfera (0,90 g) na mistura e agitamos o eppendorf em velocidade máxima utilizando um agitador vortex (180 segundos para *C. desvauxii* var. *latistipula* e 60 segundos para *C. nictitans*). Por fim, com o eppendorf ainda no agitador vortex retiramos uma sub-amostra da solução de 10 µl com uma pipeta e colocamos a amostra na câmara de Neubauer para realizar a contagem dos grãos de pólen no microscópio de luz (aumento 4x10). Para a contagem de óvulos, o ovário foi cortado longitudinalmente com uma lâmina afiada sobre uma placa de petri e levado à lupa. Para obtermos a razão P/O (pólen/óvulo) nós dividimos o número de grãos de pólen por flor pelo número de óvulos por flor em cada planta por espécie de acordo com Crudden (1977).

2.4. Padrão de visitação de espécies de abelhas em flores de *C. desvauxii* var. *latistipula* e *C. nictitans*

Para avaliar a frequência de visitas e o comportamento das abelhas durante a visitação das flores nós realizamos observações focais em 30 plantas durante um total de 22 horas em dois anos consecutivos (verão de 2018 e 2019) em cada espécie de *Chamaecrista*. Em cada dia, nós sorteamos cinco plantas entre as 30 plantas de cada espécie, e realizamos censos de 30 minutos de observação das abelhas. Realizamos um intervalo de 30 minutos entre os censos quando capturamos imagens dos visitantes florais para seu reconhecimento posterior. Durante as observações, foram registradas as seguintes informações por planta e/ou por flor: número de flores abertas; horário da visita; espécie de visitante; comportamento do visitante na flor (vibração do conjunto das anteras, vibração de cada antera individualmente, corte das anteras com a mandíbula, coleta de grãos de pólen nas pétalas e sobre as anteras), e o número de vibrações das abelhas por flor. As vibrações foram quantificadas por meio da contagem do número de vibrações emitidas pela abelha durante a vibração da musculatura do tórax (quando ocorre). Em cada planta focal observada, também quantificamos o número de flores e botões visitados. Logo após cada censo de observação das visitas, as flores foram coletadas para quantificação do número de grãos de pólen transferidos ao estigma. Para tanto, cortamos uma porção do estilete contendo a região receptora do carpelo (estigma) com o auxílio de pinças e depositamos o conteúdo em lâminas histológicas. Para facilitar a contagem de grão de pólen, o material foi corado com carmim acético (1%) e utilizamos um microscópio de luz (aumento 4x10) para a visualização dos grãos de pólen sobre o estigma.

2.5. Teste da hipótese de divisão de trabalho entre morfos de estames nas duas espécies de *Chamaecrista*

Dado que é possível caracterizar morfológicamente estames de diferentes tamanhos em flores de *C. desvauxii* var. *latistipula* e *C. nictitans*, evidenciando a heteranteria, nós realizamos um experimento manipulativo para testar a hipótese de divisão de trabalho entre os diferentes morfos do androceu. Para isso nós utilizamos múltiplas flores de 10 plantas de cada uma das espécies de *Chamaecrista* removendo diferentes conjuntos de estames do androceu para investigar a capacidade de atração visual das abelhas para cada um dos conjuntos de estames. Os tratamentos foram aplicados em dez dias ensolarados consecutivos em janeiro de 2019, e as observações das abelhas visitando as flores foi realizada no período de pico de visita para cada espécie. *Chamaecrista desvauxii* var. *latistipula* foi amostrada pela manhã das 6:30 h às 9:30 h, e *C. nictitans* das 9:30 h às 11:30 h. Nós realizamos censo de 30 minutos de observação por planta por espécie em cada tratamento totalizando 23 horas de para cada espécie de *Chamaecrista*.

As plantas amostradas foram manipuladas com a aplicação de apenas um tratamento por censo, no qual nós incluímos no máximo 10 flores virgens (botões previamente ensacados) por planta na amostragem de cada censo. Assim, todas as flores de uma mesma planta receberam o mesmo tratamento em determinado censo. Dentre as flores observadas em uma mesma planta, selecionamos uma flor focal em que avaliamos a duração da visita. Em cada planta por censo nós amostramos o número de flores disponíveis; o número de visitas totais de abelhas por planta; as visitas sucessivas entre flores dentro da planta; a duração de cada visita na flor focal; o comportamento das abelhas para a obtenção dos grãos de pólen e o morfotipo da abelha. Ao longo da amostragem foram aplicados cinco tratamentos distintos, e cada conjunto de flores por planta foram manipuladas da seguinte forma: (i) flores intactas sem manipulação (controle, CO); (ii) remoção dos estames longos (RL); (iii) remoção dos estames curtos (RC); (iv) remoção parcial de sete estames - remoção dos três estames longos e quatro estames curtos, deixando apenas três estames curtos disponíveis (RP); (v) remoção completa dos 10 estames (RT). Segundo nossas hipóteses a remoção dos estames longos tidos como de polinização não afetará o padrão de visitas das abelhas (tratamento RL), enquanto que a remoção dos estames curtos tidos como de alimentação diminuirá a frequência e duração das visitas. O quarto tratamento foi aplicado para igualar o número de anteras curtas ao número de anteras longas, desta forma a atratividade das abelhas deveria ser menor que o tratamento dois (sete anteras curtas), mas superior ao tratamento 3 (três anteras longas) segundo a hipótese de divisão de trabalho.

2.6. Avaliando o papel da autopolinização mediada pelas abelhas em flores de *C. desvauxii* var. *latistipula* e *C. nictitans*

Para investigarmos o papel da autopolinização em ambas espécies, nós manipulamos a liberação de grãos de pólen. Em flores virgens, previamente ensacadas, foram realizados três tratamentos distintos: (i) flores com obstrução completa das anteras com a aplicação de cola branca para tecido de secagem rápida (Acrilex) nos poros das anteras, evitando a transferência do auto pólen no estigma da flor (CA); (ii) flores com cola na face interna da pétala lateral da flor para investigarmos o efeito da cola na visitação e comportamento das abelhas (controle da manipulação experimental, CO); e (iii) flores sem manipulação experimental (tratamento controle, CP) permitindo a transferência de grãos de pólen entre e dentro das flores mediada pelas abelhas visitantes. Dado que a taxa de visitação de abelhas em flores da espécie *C. desvauxii* é maior do que em *C. nictitans*, realizamos censos de 30 minutos de observação das visitas das abelhas em flores de *C. desvauxii* var. *latistipula*, e censos de uma hora para observação das visitas das abelhas em flores de *C. nictitans*. Na ausência de efeito da cola na pétala, nós esperaríamos que os dois últimos tratamentos se comportassem da mesma forma. Em todos os tratamentos, as flores de ambas as espécies foram expostas à visitação das abelhas, no qual todos os visitantes florais foram quantificados. Após esse período, as flores foram coletadas para a contagem de grãos de pólen no estigma. Somente flores que receberam visitas foram consideradas para a contagem dos grãos de pólen no estigma das flores. No laboratório, a porção final do estilete com o estigma foi cortado com auxílio de pinças e depositado em lâminas histológicas. Para facilitar a contagem dos grãos de pólen o material foi corado com carmim acético 1% e observado em microscópio de luz com o aumento de 4 x 10 (Figura 3).

2.7. Teste de autocompatibilidade em flores de *C. desvauxii* var. *latistipula* e *C. nictitans*

Para avaliar a autocompatibilidade das flores das duas espécies de *Chamaecrista* nós realizamos um experimento manipulativo em 25 plantas de cada espécie (1 flor virgem *C. desvauxii* var. *latistipula* e 2 flores virgens *C. nictitans*, por tratamento). Todas as flores utilizadas foram previamente ensacadas enquanto ainda em botão floral (pré-antese). Em cada planta foram aplicados três tratamentos: (i) flores sem manipulação expostas à visitação natural das abelhas (controle - PN); (ii) flores autopolinizadas manualmente (AM), onde o pólen das anteras foi removido com o auxílio de palito fino ou agulha, e em seguida, depositado no estigma da própria flor; (iii) flores ensacadas e protegidas durante todo o período de antese floral evitando a visitação das abelhas (AE). Neste último tratamento as flores não foram manipuladas diretamente e avaliamos a formação espontânea de frutos. Em todos os tratamentos nós avaliamos se houve a formação de frutos nas duas espécies de *Chamaecrista*.

2.8. Análises de dados

Para análise de comparação da morfologia floral entre as espécies de *C. desvauxii* var. *latistipula* e *C. nictitans*, realizamos uma análise de variância 1-fator (ANOVA), e adicionamos planta com variável aleatória para cada uma das variáveis morfológicas: comprimento máximo da sépala mais externa (referência do tamanho floral); distância do poro da antera mais próxima do estigma; distância entre o poro da antera mais distante em relação ao estigma; comprimento de todos os estames individualmente (antera mais filete); diâmetro e espessura dos poros das anteras e diâmetro do estigma (em flores virgens, e em flores visitadas). O padrão de visitação de espécies de abelhas foram relacionados com a deposição de pólen no estigma das flores de *C. desvauxii* var. *latistipula* e *C. nictitans*, nós utilizamos um modelo linear generalizado misto com distribuição probabilística de Poisson, no qual a variável resposta foi o número de grãos de pólen no estigma (variável do tipo contagem), e o fator fixo o número de visitas por flor em censos de 30 minutos.

Para investigarmos se a diferença no tamanho das flores está correlacionada com mudanças na produção relativa de grãos de pólen e óvulos utilizamos um modelo linear, com as variáveis respostas sendo o número de grão de pólen por flor (variável do tipo contagem), número de óvulo (variável do tipo contagem) e razão pólen/óvulo (variável do tipo contagem) e a variável categórica espécie.

Nós também testamos a hipótese de divisão de trabalho entre morfos de estames em cada uma das espécies de *Chamaecrista* separadamente. Para isso, usamos um modelo linear generalizado misto com distribuição probabilística binomial negativa, no qual o número total de visitas (variável do tipo contagem) foi a variável resposta. Adicionalmente, nós também avaliamos se a duração média das visitas (variável do tipo contagem) foi diferente entre os tratamentos utilizando um modelo linear misto com distribuição probabilística gaussiana. Neste caso, nós aplicamos uma transformação logarítmica na variáveis original (logaritmo neperiano). Para verificar quais tratamentos diferiam entre si nós aplicamos um teste de Tukey a posteriori.

Para investigarmos se flores pequenas de *C. nictitans* favorecem uma maior taxa de autopolinização em relação as flores maiores de *C. desvauxii*, nós utilizamos um modelo linear generalizado misto com distribuição probabilística binomial negativa, para relacionar com as variáveis respostas deposição dos grãos de pólen no estigma (variável do tipo contagem) e o número de visitas (variável do tipo contagem) e como variável predatória, o tratamento de manipulação floral com três níveis (CO, CP, e CA). Para verificar quais tratamentos diferiram entre si em cada um dos experimentos, nós aplicamos um teste de Tukey a posteriori. Em todas

as situações em que múltiplas flores foram amostradas por planta, a identidade das plantas foi incluída nos modelos como uma variável aleatória.

Realizamos nossas análises no software R 1.1-17 (Rstudio, 2018) e os pacotes adicionais MASS (Venables & Ripley, 2002), LME4 (Bates *et al*, 2015), NLME (Pinheiro *et al*, 2017), GLMMADMB (Fournier *et al*, 2012), CAR (Fox & Weisberg, 2011), MGCV (Wood, 2017), MULTCOMP (Hothorn *et al*, 2008), R2ADMB (Bolker *et al*, 2017).

3. Resultado

A antese floral de *C. desvauxii* var. *latistipula* e *C. nictitans* ocorre nas primeiras horas da manhã, inicia-se aproximadamente as 6:00 h e se encerra por volta das 12:00 h. O número de flores abertas por dia em *C. nictitans* é seis vezes maior que de *C. desvauxii*, sendo em média 16 ± 9 flores e 4 ± 3 flores por planta, respectivamente.

3.1. Como a diferença no tamanho floral modifica a morfologia das flores, o grau de hercogamia e heteranteria nas duas espécies de *Chamaecrista*?

As flores em antese de *C. desvauxii* têm um diâmetro de 2 cm, sendo quatro vezes maiores que as flores de *C. nictitans*, com diâmetro aproximado de 0,5 cm (Figura 1). Independente do tamanho floral, ambas as espécies possuem flores com cinco verticilos, incluindo de fora para dentro da flor cinco sépalas, cinco pétalas sendo uma delas maior e levemente curvada chamada cucculus, dois ciclos de cinco estames, e o gineceu unicarpelar na região central da flor. As duas espécies possuem o pólen como único recurso floral protegidos dentro de anteras com deiscência poricida, e ambas espécies são enantiofilicas monomórficas, isto é, possuem flores com estilete a direita e a esquerda na mesma planta.

Para descrever o grau de hercogamia nas flores de *Chamaecrista*, nós quantificamos a distância entre a região estigmática e os poros das anteras. Em *C. desvauxii* var. *latistipula*, a distância média entre o estigma e o poro da antera mais próxima foi de $3,1 \pm 1,5$ mm, enquanto que em *C. nictitans* foi de $1,24 \pm 0,42$ mm ($F = 26,6$; $N = 20$; $p < 0.001$) (Figura 2A). Adicionalmente, a distância entre o estigma e antera mais distante em *C. desvauxii* var. *latistipula* foi de $5,9 \pm 0,9$, enquanto que em *C. nictitans* a distância média foi de $3,3 \pm 0,5$ ($F = 123,4$; $N = 20$; $p < 0.001$) (Figura 2B). Em geral, as estruturas reprodutivas das flores de *C. nictitans* estiveram mais próximas entre si quando comparado com flores de *C. desvauxii* var. *latistipula*. O grau de separação espacial entre poro da antera e estigma (hercogamia) foi maior em *C. desvauxii* var. *latistipula* do que em *C. nictitans*.

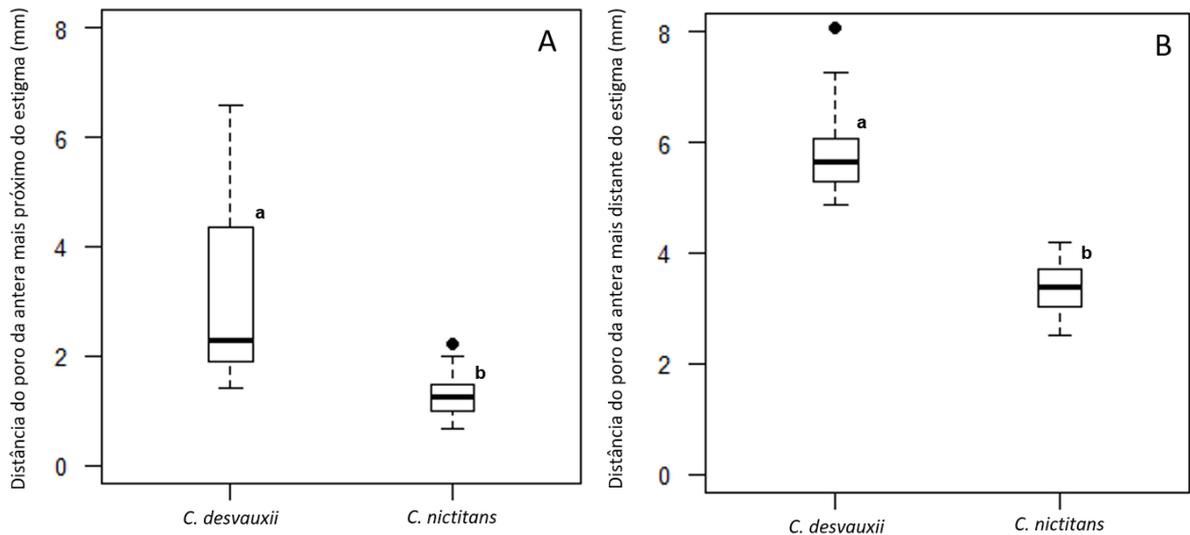


Figura 2: Diferença nas distâncias entre os órgãos reprodutivos em flores de *Chamaecrista desvauxii* var. *latistipula* e *Chamaecrista nictitans* (Leguminosae): **(B)** distância entre o poro da antera mais próxima do estigma e **(C)** distância entre o poro da antera mais distante do estigma.

Em média, o diâmetro do estigma foi semelhante nas flores virgens no início da antese de *C. desvauxii* var. *latistipula* e *C. nictitans* ($F = 0,23$; $N = 20$; $p = 0,63$ - Figura 3A). No entanto, o diâmetro do estigma foi maior em flores de *C. nictitans* coletadas no final da antese expostas a visitação das abelhas em comparação com as flores em situação semelhante de *C. desvauxii* var. *latistipula* ($F = 27,3$; $N = 20$; $p < 0,001$ - Figura 3B). Nas imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura a espécie *C. nictitans* teve a superfície estigmática do gineceu mais exposta do que observado em *C. desvauxii* var. *latistipula* (Figura 4A e D).

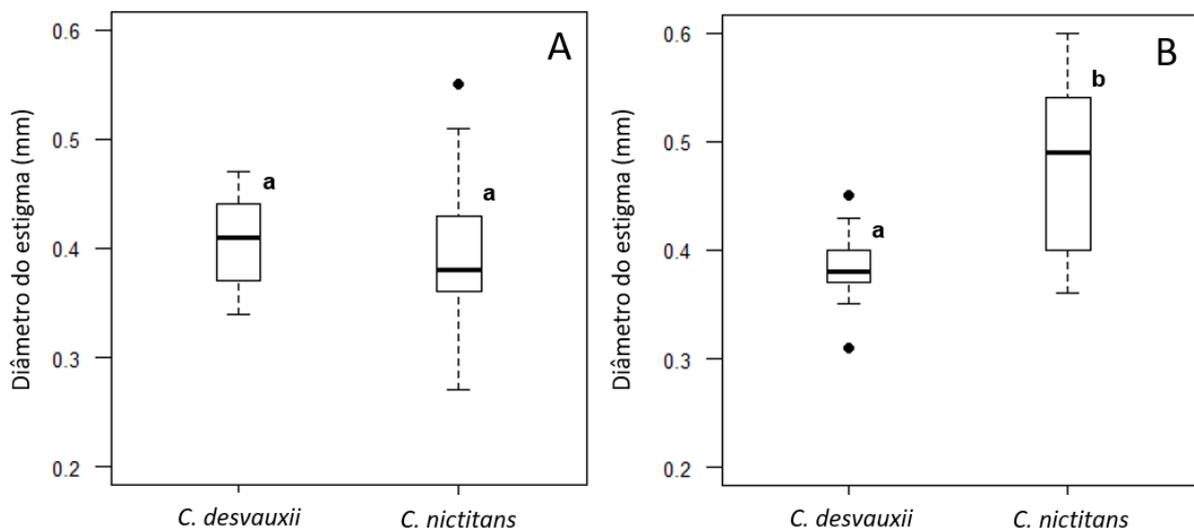


Figura 3: Diferença no diâmetro do estigma em flores de *Chamaecrista desvauxii* var. *latistipula* e *Chamaecrista nictitans* (Leguminosae). **(A)** Diâmetro do estigma de flores virgens no início da antese; **(B)** Diâmetro do estigma de flores no final da antese visitadas pelas abelhas.

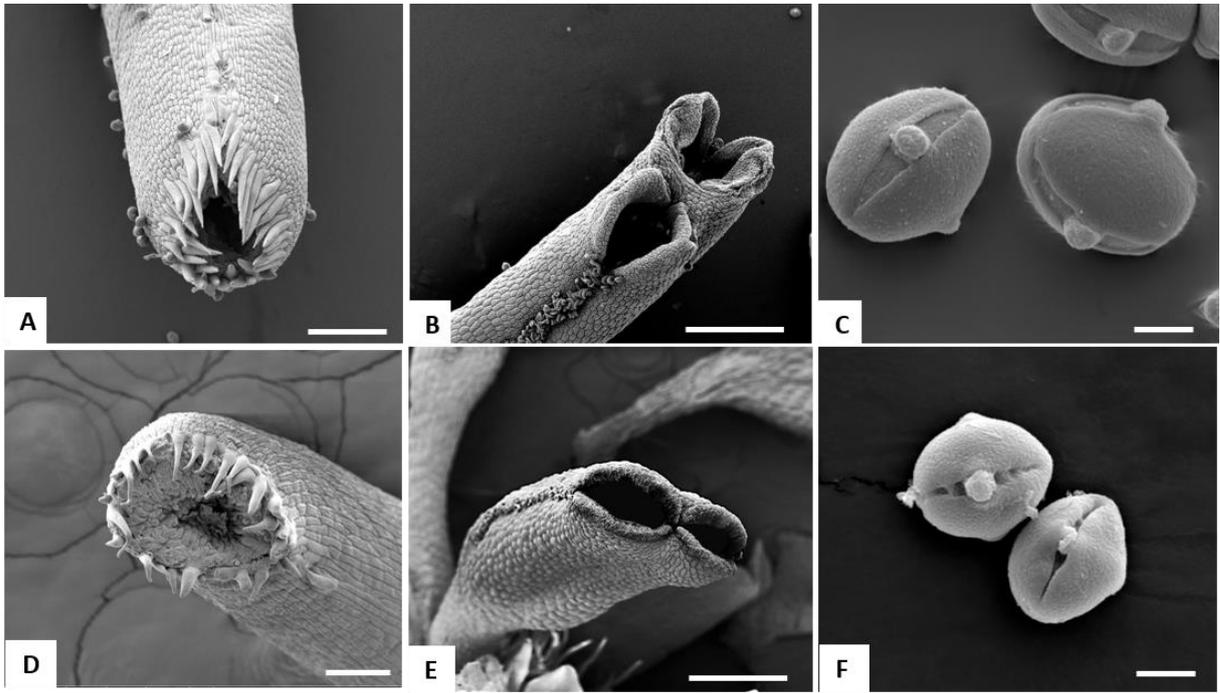


Figura 4: Região estigmática, poros das anteras e grãos de pólen de *Chamaecrista desvauxii* var. *latistipula* e *Chamaecrista nictitans*. (Leguminosae). Flores de *C. desvauxii*: (a) região estigmática, (b) poro da antera; e (c) grãos de pólen. Flores de *C. nictitans*: (d) região estigmática; (e) poro da antera; e (c) grãos de pólen. Escala: 500 μ m.

Nas flores de *C. desvauxii* os estames diferiram no seu comprimento, sendo que três estames do ciclo mais externo do androceu – E1, E2 e E3 – tiveram anteras maiores que as demais (Figura 5A). Nas flores de *C. nictitans* existiu uma diferença menor no comprimento dos estames, e os cinco estames do ciclo mais externo do androceu – E1, E2, E3, E4 e E5 – tiveram anteras levemente maiores que as demais (Figura 5D). O secção máxima e mínima do poro da antera em flores de *C. desvauxii* var. *latistipula* foram em média duas vezes maior do que em *C. nictitans*, sendo de $0,4 \pm 0,1$ mm e $0,2 \pm 0,1$ mm (Figura 5B e C), enquanto que em flores de *C. nictitans* foram de $0,23 \pm 0,02$ mm e $0,10 \pm 0,02$ mm (Figura 5E e F).

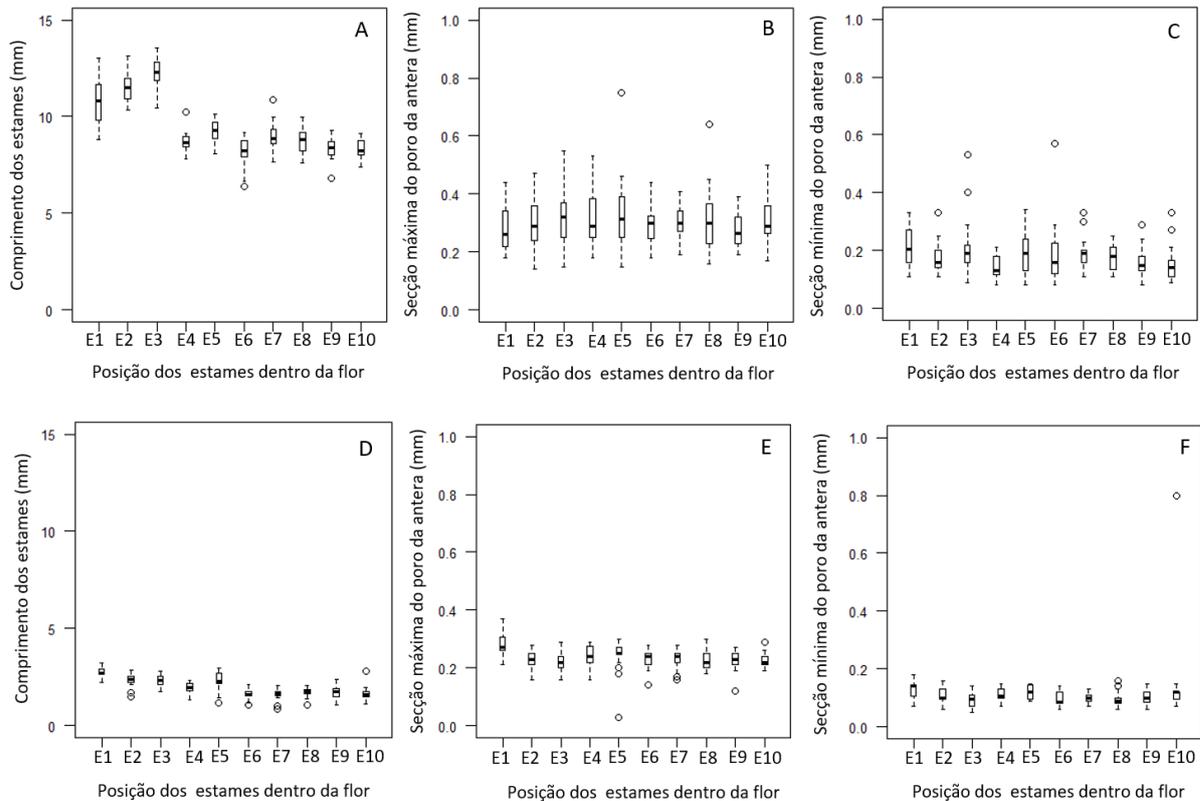


Figura 5: Ciclos de estames de *Chamaecrista desvauxii* var. *latistipula* e *Chamaecrista nictitans*. (Leguminosae). Flores de *C. desvauxii*: (A) comprimento total dos estames; (B) Secção máxima do poro da antera; (C) Secção mínima do poro da antera. Flores de *C. nictitans*: (D) comprimento total dos estames; (E) Secção máxima do poro da antera; (F) Secção mínima do poro da antera.

3.2. A diferença no tamanho das flores está correlacionada com mudanças na produção relativa de grãos de pólen e óvulos?

Em média, flores de *C. desvauxii* tiveram 15 vezes mais grãos de pólen do que flores de *C. nictitans* ($F = 441,9$; $p < 0,001$ - Figura 6A). O número médio de grãos de pólen em flores de *C. desvauxii* var. *latistipula* foi de 124473 ± 35776 , enquanto que em flores de *C. nictitans* foi de 8346 ± 3679 . De forma semelhante, flores de *C. desvauxii* var. *latistipula* produziram mais óvulos do que flores de *C. nictitans* ($F = 94,4$; $p < 0,001$ - Figura 6B), em média 17 ± 1 óvulos e 9 ± 1 óvulos, respectivamente. A razão pólen/óvulo encontrada nas flores de *C. desvauxii* var. *latistipula* foi 8 vezes maior do que nas flores de *C. nictitans* ($F = 64,49$; $p < 0,001$ - Figura 6C).

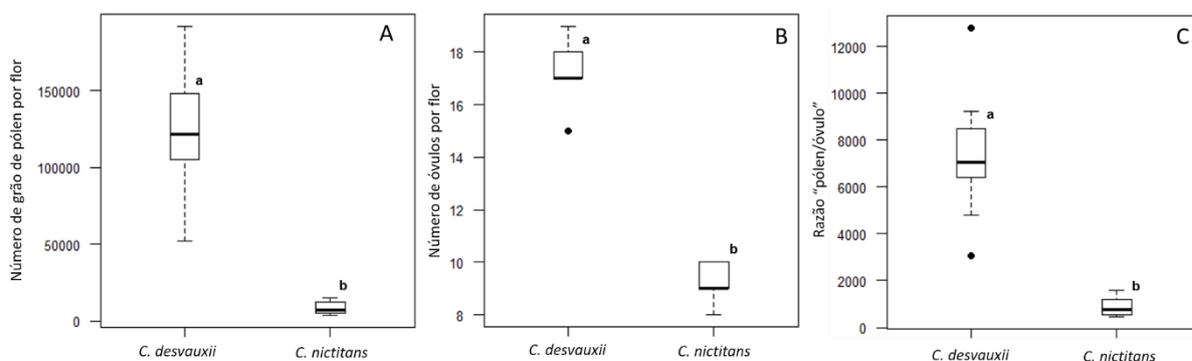


Figura 6: Número de grãos de pólen e óvulos em *Chamaecrista desvauxii* var. *latistipula* e *Chamaecrista nictitans* (Leguminosae). (A) Número de grão de pólen por flor; (B) Número de óvulos por flor; (C) Razão pólen/óvulo.

3.3. As diferenças no tamanho floral e disponibilidade de recursos geram mudanças na assembleia de polinizadores e antagonistas?

Ao todo tivemos 10 morfoespécies de abelhas visitando as flores de *C. desvauxii* var. *latistipula* (Figura 7) e uma morfoespécie de mosca (Figura 7 G, H e I); e 8 morfoespécies de abelhas visitando as flores de *C. nictitans* (Figura 8). Em geral, o comportamento das abelhas foi semelhante em ambas as espécies de *Chamaecrista*, no qual a grande maioria das abelhas vibrou as anteras poricidas para acessar os grãos de pólen. Nas visitas nas flores de *C. nictitans*, todos os visitantes tocaram a região estigmática, sendo considerados potenciais polinizadores. Já em *C. desvauxii* var. *latistipula*, alguns visitantes florais não tocaram a superfície estigmática e foram considerados antagonistas (Figura 9). Ao todo observamos os visitantes florais ao longo de 22 horas em cada espécie de *Chamaecrista* (44 censos de 30 minutos cada), sendo que ao fim do período, totalizamos observações em 819 flores em *C. desvauxii* var. *latistipula* e 5342 flores em *C. nictitans* (N = 30 plantas por espécie).

Chamaecrista desvauxii var. *latistipula* e *C. nictitans* compartilharam duas espécies de abelhas visitantes *Dialictus* sp. e *Augochloropsis* sp. Nas flores de *C. desvauxii* var. *latistipula*, *Dialictus* sp. não tocou o estigma durante suas visitas embora tenha sido a terceira espécie mais frequente, o mesmo ocorreu com *Augochloropsis* sp, a quinta espécie mais frequente. Essas espécies de abelhas são relativamente pequenas dentro das flores de *C. desvauxii* var. *latistipula* e realiza vibrações em cada uma das anteras poricidas, coletando grãos de pólen diretamente das anteras e os grãos de pólen dispersos sobre a pétala maior curvada. Em *C. nictitans*, *Dialictus* sp. vibra as anteras, e se movimenta muito dentro da flor, tocando todas as estruturas reprodutivas, incluindo a região estigmática. As espécies de abelhas que tiveram a maior frequência de visitação em *C. desvauxii* var. *latistipula* foram abelhas maiores, que agarram todas as anteras de uma são vez, vibrando toda a flor (*Bombus morio* e *Eulema nigrita*). A espécie

Pseudaugochlora graminea tem um comportamento semelhante a *Dialictus* sp. e vibra individualmente as anteras uma a uma, realizando visitas mais demoradas dentro das flores. Nas flores de *C. nictitans*, a maior parte dos visitantes foram abelhas de pequeno porte, como *Centris tarsats*, a abelha sp 1 e *Augochloropsis* sp., e todas tocaram as estruturas reprodutivas. Indivíduos de *Bombus morio* com tamanho corporal menor também realizaram visitas esporádicas em flores de *C. nictitans*, vibrando toda a flor.

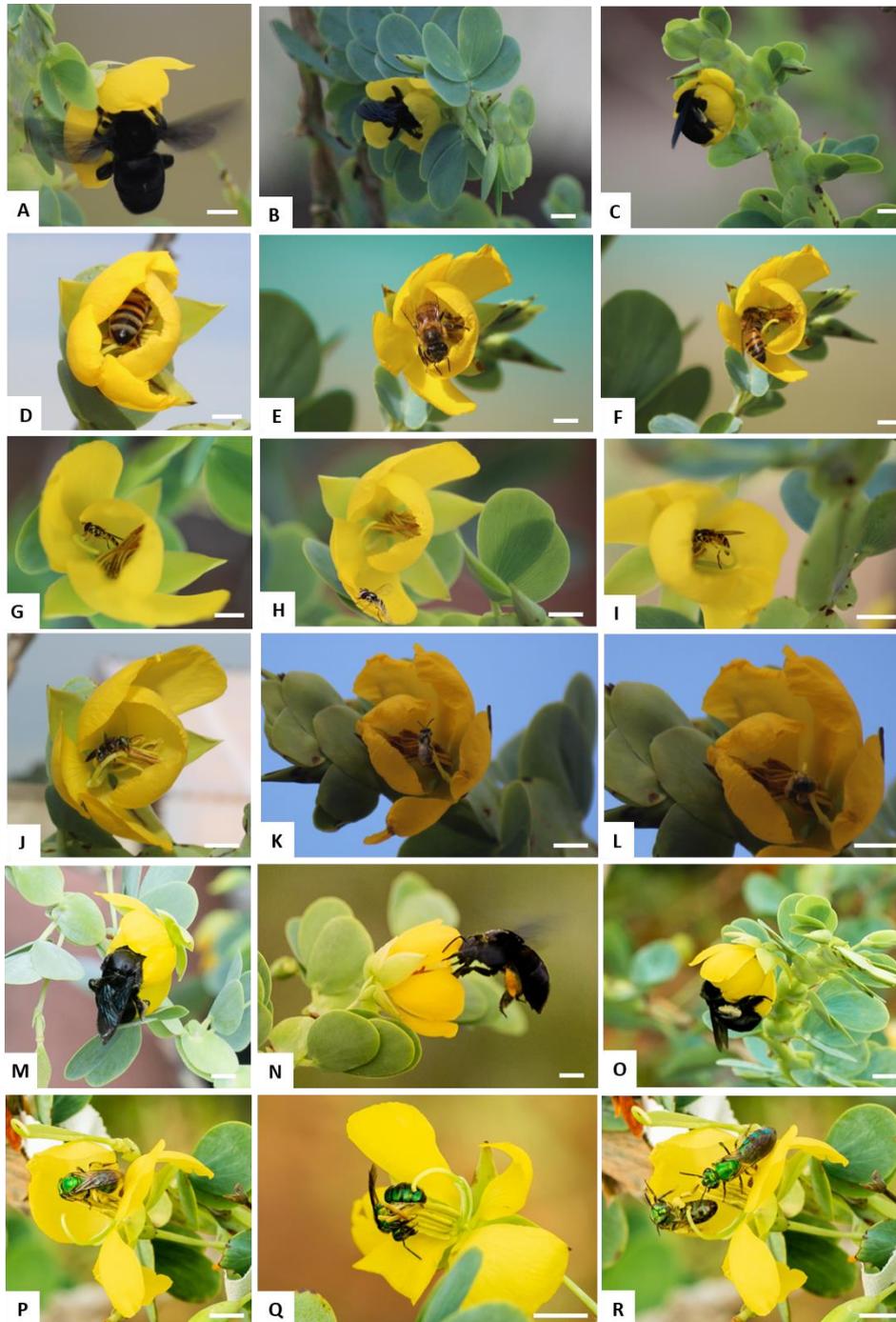


Figura 7: Principais visitantes das flores de *Chamaecrista desvauxii* var. *latistipula* (Leguminosae). Abelhas: (A, B, C) *Bombus morio*; (D,E,F) *Apis mellifera*; (J,K,L) *Dialictus* sp.; (M,N,O) *Eulaema nigrita* e (P,Q,R) *Pseudaugochlora graminea*. Mosca: (G,H,I) sp1. Escala 0,5cm.

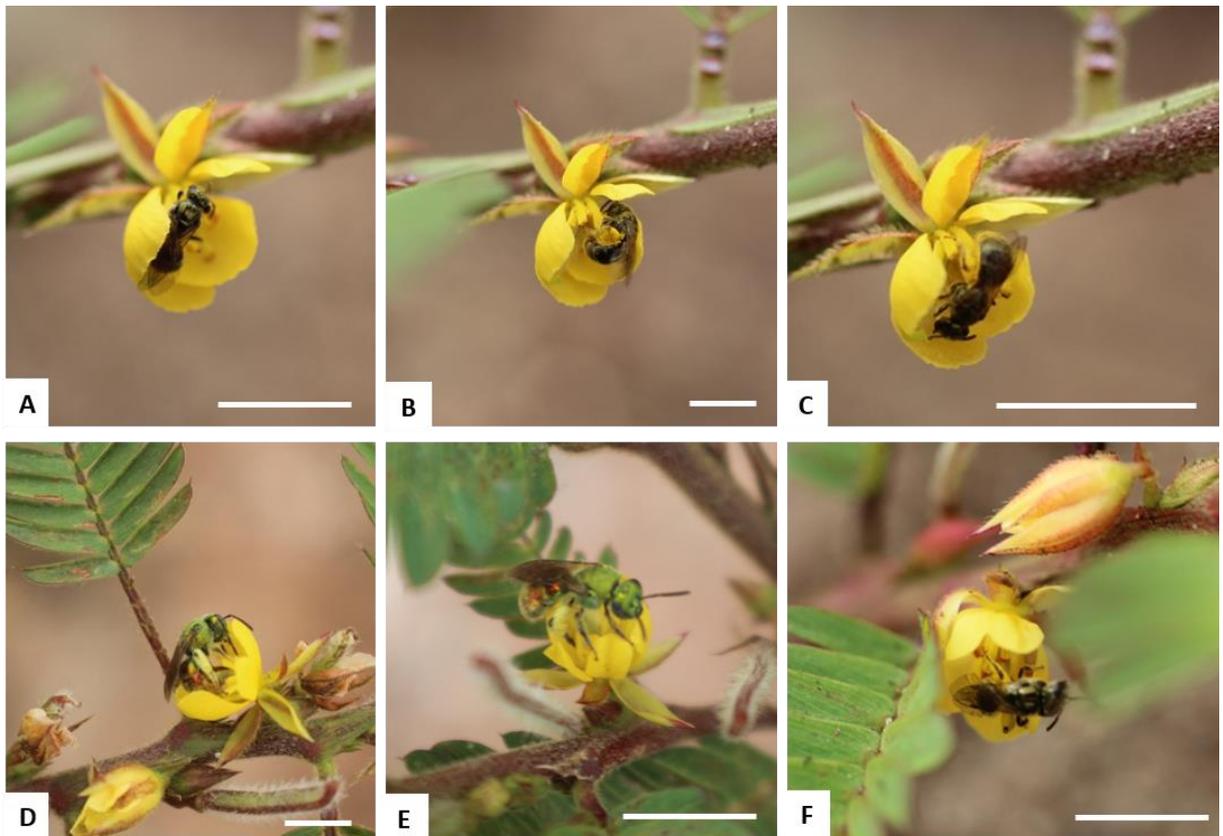


Figura 8: Principais visitantes das flores de *Chamaecrista nictitans* (Leguminosae), em sua totalidade abelhas: (A, B, C) - *Dialictus* sp.; (D, E) – *Augochloropsis* sp. e (F) sp1. Escala 0,5 cm.

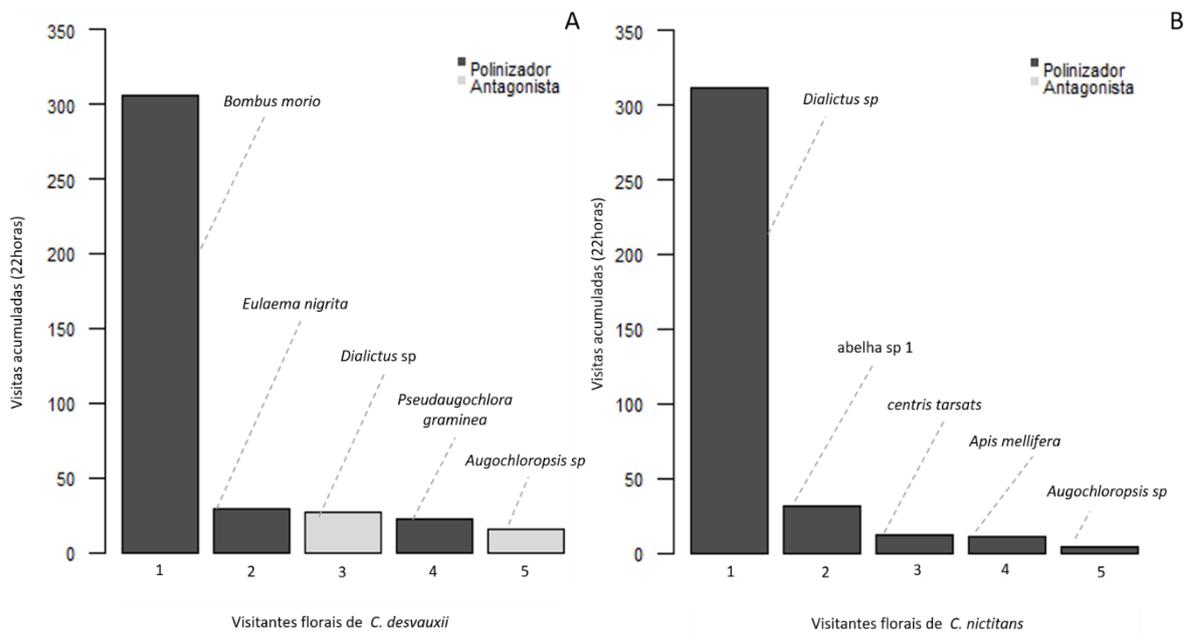


Figura 9: Número acumulado de visitas das espécies de abelhas mais frequentes nas flores das duas espécies de *Chamaecrista*: (A) *Chamaecrista desvauxii* var. *latistipula* e (B) *Chamaecrista nictitans*. As abelhas foram consideradas polinizadoras quando tocaram no estigma das flores durante a coleta do pólen nas anteras porcidas; as abelhas foram consideradas antagonistas quando não tocaram no estigma.

Em *C. desvauxii* var. *latistipula* (Figura 10A), flores com apenas uma visita tiveram, em média, 14 ± 20 grãos de pólen no estigma, enquanto em *C. nictitans* 43 ± 50 grãos de pólen (Figura 10B). Esse padrão sugere que com apenas uma visita, as flores de *C. nictitans* já têm um conjunto de grãos de pólen suficiente para fertilização dos óvulos, diferentemente de *C. desvauxii*. Flores de *C. nictitans*, mesmo não visitadas pelas abelhas tiveram em média 13 ± 24 grãos de pólen no estigma. Em média, o número de visitas por flor de *C. desvauxii* var. *latistipula* foi de $3,3 \pm 3,0$ por censo de 30 minutos ($F = 5,6$; $N_{\text{flores}} = 52$; $N_{\text{plantas}} = 28$; $p < 0,001$), enquanto que em flores de *C. nictitans* foi de $1,0 \pm 1,4$ por censo de 30 minutos ($F = 15,8$; $N_{\text{flores}} = 317$; $N_{\text{plantas}} = 28$; $p < 0,001$).

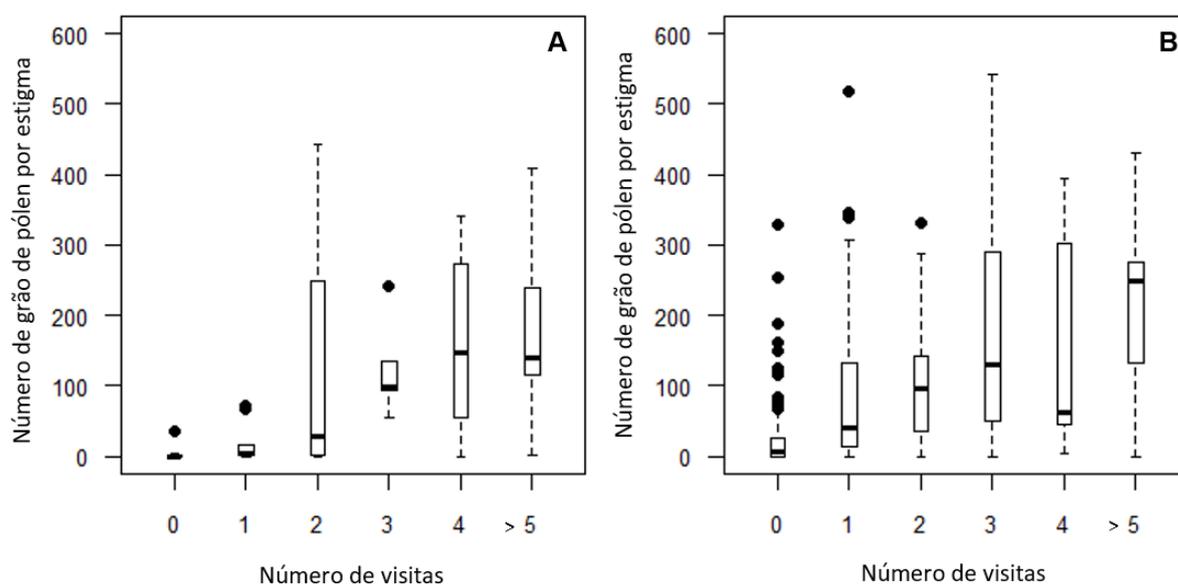


Figura 10: Relação entre o número de grãos de pólen no estigma e o número de visitas por flor em (A) *Chamaecrista desvauxii* var. *latistipula* e (B) *Chamaecrista nictitans*.

3.4. Existe divisão de trabalho entre os morfos das anteras nas flores pequenas de *C. nictitans* e flores maiores de *C. desvauxii* var. *latistipula*?

Para testar a hipótese de divisão de trabalho nós manipulamos os estames curtos e longos para avaliar a atratividade visual da flor e a duração média de cada visita das abelhas. O número médio de visitas diferiu entre o conjunto de flores de cada tratamento em *Chamaecrista desvauxii* ($z = -4.0$; $N_{\text{flores}} = 59$; $N_{\text{plantas}} = 19$; $p < 0.001$) e em *Chamaecrista nictitans* ($z = -2.2$; $N_{\text{flores}} = 48$; $N_{\text{plantas}} = 19$; $p = 0.02$). Em ambas as espécies, a visitação das abelhas foi menor apenas no conjunto de flores com remoção total das anteras (Figura 11A e 12A). A duração média das visitas das abelhas também diferiu entre o conjunto de flores em *Chamaecrista desvauxii* ($z = -3.4$; $N_{\text{flores}} = 59$; $N_{\text{plantas}} = 20$; $p < 0.001$) e em *Chamaecrista nictitans* ($z = -3.1$; $N_{\text{flores}} = 48$; $N_{\text{plantas}} = 19$; $p = 0.002$). Em ambas as espécies, a duração média da visita das

abelhas foi menor apenas no conjunto de flores com remoção total das anteras (Figura 11B e 12B).

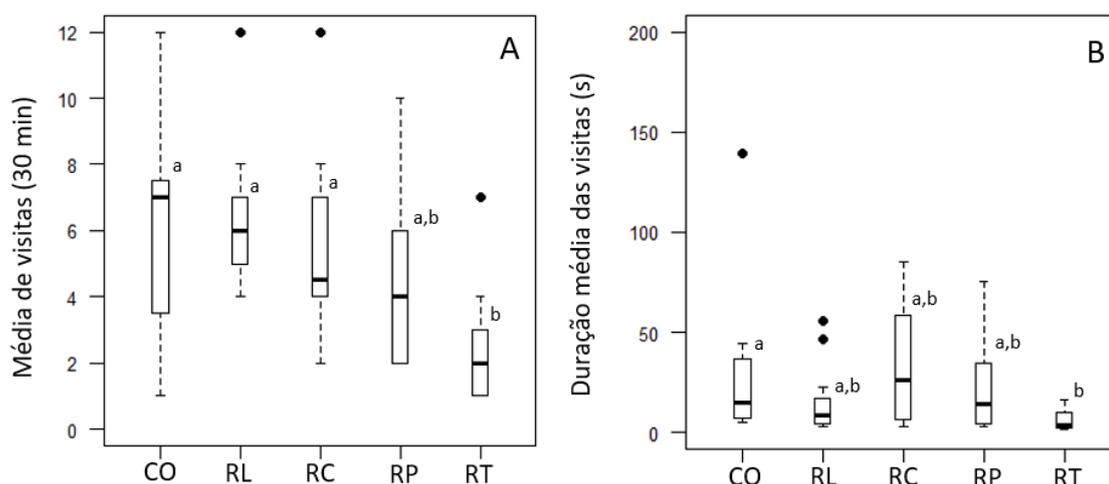


Figura 11: Avaliação da atratividade visual para cada conjunto de estames de *C. desvauxii* var. *latistipula*, em censos de 30 min de observação por conjunto de flores : CO – controle (flor intacta); RL – remoção das anteras curtas; RC – remoção das anteras longas; RP – remoção parcial das anteras curtas (remoção de quatro anteras curtas e três anteras longas) e RT – remoção total das anteras. (A) Número médio de visitas por flor; (B) duração média das visitas.

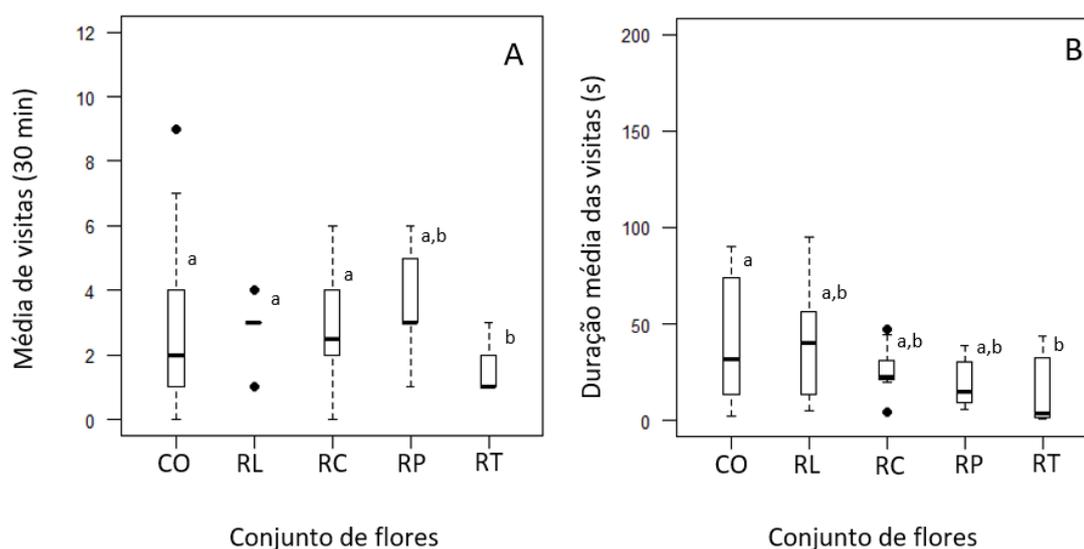


Figura 12: Avaliação da atratividade visual para cada conjunto de estames de *C. nictitans*, em censos de 30 min de observação por conjunto de flores :CO – controle (flor intacta) ; RL – remoção das anteras curtas; RC – remoção das anteras longas; RP – remoção parcial das anteras curtas (remoção de quatro anteras curtas e três anteras longas) e RT – remoção total das anteras. (A) Número médio de visitas por flor; (B) duração média das visita.

3.5. Flores pequenas de *C. nictitans* favorecem uma maior taxa de autopolinização em relação as flores maiores de *C. desvauxii* var. *latistipula*?

Em *C. nictitans*, aproximadamente 24% das flores foram autopolinizadas espontaneamente, o que nunca ocorreu com flores de *C. desvauxii* (Figura 13). Esse tratamento

foi o único que diferiu dos demais em *C. nictitans* ($F= 55,2$; $N_{\text{flores}} = 237$; $N_{\text{plantas}} = 30$; $p < 0,0001$) e *C. desvauxii* var. *latistipula* ($F= 55,2$; $N_{\text{flores}} = 293$; $N_{\text{plantas}} = 30$; $p < 0,001$). Em ambas as espécies, o tratamento de autopolinização manual foi semelhante ao tratamento de polinização natural, no qual a taxa de formação de frutos foi superior a 70 % das flores.

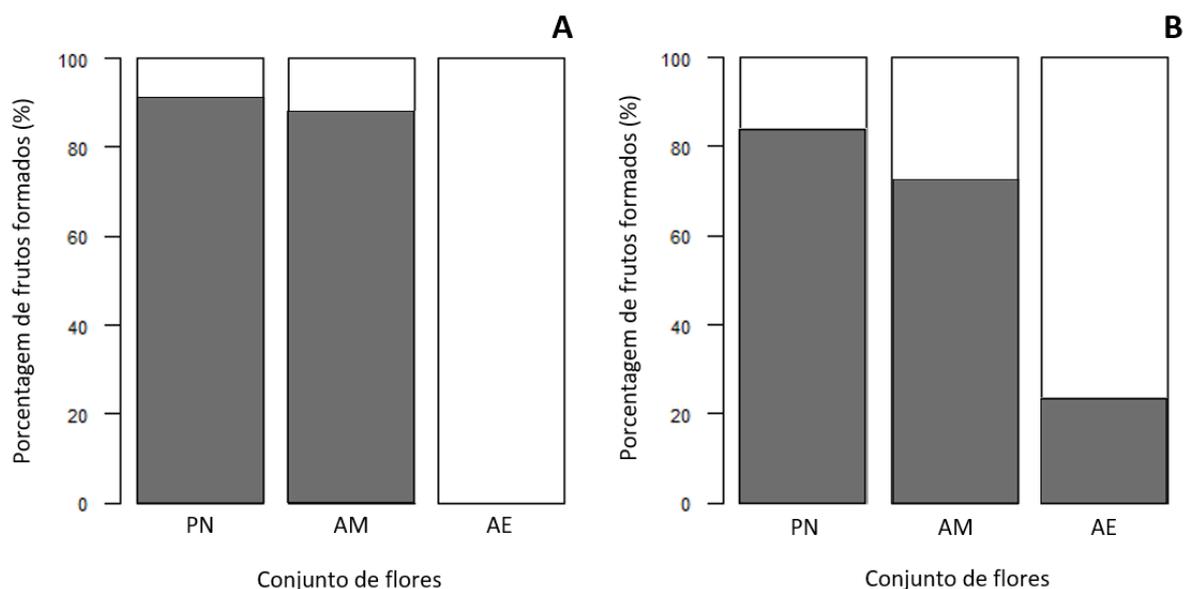


Figura 13: Porcentagem de flores convertidas em frutos em *Chamaecrista desvauxii* var. *latistipula* (A) e *Chamaecrista nictitans* (B) em três tratamentos diferentes de polinização: polinização natural (PN); autopolinização manual (AM) e autopolinização espontânea (AE). A trecho vazio da barra representa as flores que não foram convertidas em frutos, e o trecho cinza representa a porcentagem de flores que formaram frutos em cada tratamento.

Para investigar a importância da autopolinização no sucesso reprodutivo das espécies de *Chamaecrista*, nós manipulamos as flores obstruindo os poros das anteras para evitar a autopolinização em um dos tratamentos. Em *C. desvauxii* var. *latistipula*, as flores que tiveram as anteras obstruídas receberam uma carga polínica menor no estigma quando compara com flores sem manipulação (controle) ou flores que receberam cola na pétala ($F = 12,1$; $N_{\text{flores}} = 94$; $N_{\text{plantas}} = 21$; $p < 0,001$) (Figura 12A). Adicionalmente, não tivemos diferença no padrão de visita das abelhas entre os tratamentos em *C. desvauxii* var. *latistipula* ($F = 1,4$; $N_{\text{flores}} = 94$; $N_{\text{plantas}} = 21$; $p = 0,11$) (Figura 12C). Já em *C. nictitans*, as flores com anteras obstruídas tiveram menos grãos de pólen no estigma do que flores não manipuladas (controle) ou flores que receberam cola na pétala ($F = 5,3$; $N_{\text{flores}} = 31$; $N_{\text{plantas}} = 8$; $p < 0,001$) (Figura 14B). Também não tivemos diferença no padrão de visitas de abelhas entre os tratamentos ($F = 0,5$; $N_{\text{flores}} = 31$; $N_{\text{plantas}} = 8$; $p = 0,3$) (Figura 14D).

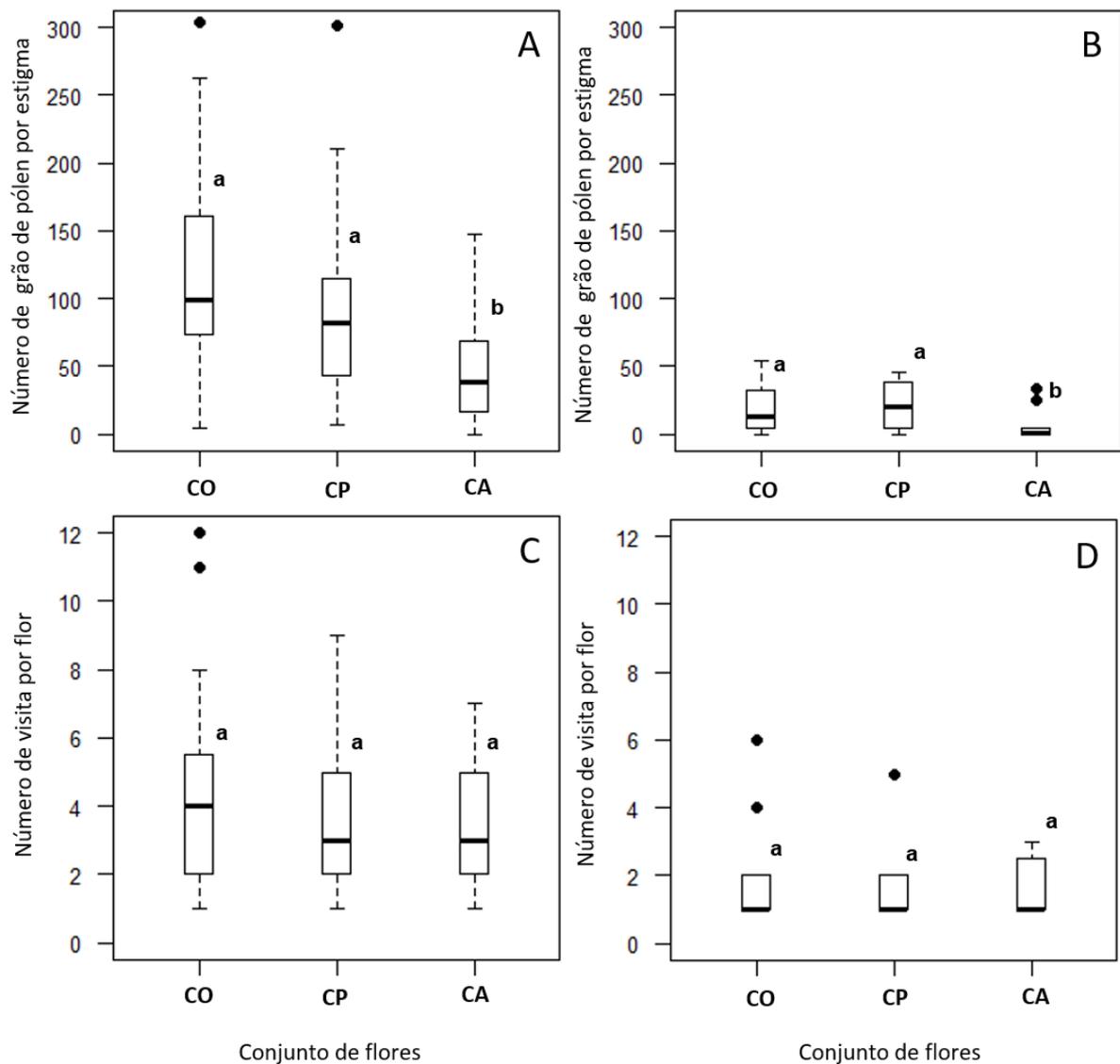


Figura 14: Relação entre a deposição dos grãos de pólen no estigma e a origem dos grãos de pólen durante o processo de polinização em flores de *C. desvauxii* var. *latistipula* e *C. nictitans*. (A) número de grão de pólen por estigma de *C. desvauxii* var. *latistipula*; (B) número de grão de pólen por estigma de *C. nictitans*; (C) número de visitas por flor em *C. desvauxii* var. *latistipula*; (D) número de visitas por flor em *C. nictitans*. Os tratamentos aplicados nas flores foram: CO – controle (flor intacta); CP – flores que receberam cola na pétala, e CA – flores que receberam cola nos poros das anteras impedindo a saída do auto pólen, evitando a autopolinização das flores.

4. Discussão

Neste estudo investigamos como diferenças no tamanho floral em duas espécies de leguminosa com flores de pólen determinam o processo de polinização e as estratégias reprodutivas mediada pela visitação das abelhas. As flores de ambas espécies de *Chamaecrista* (Fabaceae) possuem somente o pólen como recurso floral para atrair os polinizadores, e esse não é exposto facilmente para o ambiente, pois a deiscência de suas anteras é poricida. O fato

do pólen conter o gameta masculino e ser utilizado como recurso alimentar pelas ninfas das abelhas gera um conflito potencial para a planta conhecido como dilema do pólen, por restringir potencialmente a quantidade de pólen disponível para a reprodução sexuada das plantas (Westerkamp, 1996). Dessa forma, flores com diferentes tamanhos sofrem de maneira distinta a pressão exercida pelas abelhas na exploração dos grãos de pólen, e podem ter soluções distintas para garantir a sua segurança reprodutiva. Enquanto flores de pólen maiores seriam otimizadas ‘economizando’ grãos de pólen em anteras de polinização menos visíveis ou disponíveis as abelhas, a segurança reprodutiva em flores de pólen menores seria garantida por meio da autofertilização de seus óvulos (Vallejo et al. 2014).

Nossos resultados fornecem evidências de que o tamanho reduzido das flores em *C. nictitans* minimiza o dimorfismo entre anteras, proporcionando a quebra da heteranteria e uma redução da separação espacial antera/estigma (hercogamia), ao contrário do que ocorre nas flores de *C. desvauxii* var. *latistipula*, em que o dimorfismo entre anteras é mais evidente e há espaço dentro da flor para que ocorra a separação espacial entre antera/estigma, isto é, maior grau de hercogamia. Segundo Vallejo e colaboradores (2014) a mudança no tamanho floral está correlacionada com mudanças nas relações alométricas entre os órgãos florais (androceu e gineceu), mudanças na assembleia de abelhas visitantes, e mudanças no sistema reprodutivo dessas plantas. Em nosso estudo, as flores de *C. desvauxii* foram quatro vezes maiores que as flores de *C. nictitans*, com quinze vezes mais grãos de pólen por flor e um conjunto de abelhas visitantes mais abundante e diverso, incluindo abelhas grandes que raramente visitam flores de *C. nictitans*. Adicionalmente, as flores de *C. desvauxii* var. *latistipula* tiveram uma maior razão pólen/óvulos quando comparada com flores de *C. nictitans*, o que sugere que *C. nictitans* poderia ser considerada uma espécie xenógama facultativa, enquanto que *C. desvauxii* var. *latistipula* xenógama obrigatória de acordo com Cruden (1977).

Nossos resultados não corroboraram a hipótese de divisão de trabalho associado ao dimorfismo dos estames nas flores de ambas as espécies de *Chamaecrista*. Como é proposto para espécies que tem divisão de trabalho entre as anteras, as anteras de alimentação forneceriam o recurso para as abelhas e seriam, em geral, menores em tamanho, vistosas e localizadas no centro da flor de mais fácil acesso; já as anteras de polinização seriam anteras maiores, menos vistosas ou distantes do centro da flor, e sua principal função seria dispersar os grãos de pólen em locais específicos no corpo do polinizador para favorecer a polinização (Vallejo-Marín et al. 2009). Portanto, nossa expectativa inicial era de que as flores maiores de *C. desvauxii*, com heteranteria mais evidente, estivessem de acordo com a hipótese de divisão de trabalho. Já em flores pequenas como em *C. nictitans* as estruturas morfológicas são muito

mais reduzidas, com menor diferenciação de tamanho entre os morfos das anteras, portanto, reduzindo o grau de heteranteria ou até mesmo levando a uma quebra da heteranteria.

Sabe-se que a frequência de visitação dos polinizadores pode variar de acordo com atração visual dos estames (Luo et al. 2008). Em um experimento com *Melastoma malabathricum* (*Melastomataceae*), no qual foram removidos da flor os estames longos (“anteras de polinização”), o número de visitas se manteve similar à das flores intactas, na qual não houve manipulação das anteras. No entanto, quando foram removidos os estames curtos (“anteras de alimentação”), houve uma redução expressiva das visitas, indicando uma redução na atração visual das abelhas em flores que tiveram as anteras de alimentação removidas em comparação com flores com as anteras de polinização removidas (Luo et al. 2008). Esse padrão não foi encontrado nas duas espécies de *Chamaecrista*, que não se constatou diferença no número de visitas e duração das visitas quando removido o conjunto de anteras curtas “anteras de alimentação” ou o conjunto de anteras longas “anteras de polinização” em relação ao conjunto de flores do tratamento controle sem manipulação experimental.

Luo e colaboradores (2008) citam em seu trabalho que os conjuntos de estames de alimentação e polinização se diferenciam não apenas pela sua atratividade visual, mas também pela abertura do poro das anteras no qual os grãos de pólen são ejetados para o corpo do polinizador. Esta diferença na abertura do poro não foi verificada entre o conjunto de anteras nas flores de *C. desvauxii* var. *latistipula* e nas flores de *C. nictitans*. De forma distinta, é possível que os dois grupos de estames (longos e curtos) tenham uma diferença na direção da abertura dos poros mais ou menos associada à pétala maior, o cucculus, comumente encontrada nessas flores (Nogueira et al. 2018). No entanto, nós não avaliamos o papel da pétala e a direção dos poros das anteras, que poderão ser investigados futuramente para reavaliar a hipótese de divisão de trabalho nessas flores, especialmente na flor maior de *C. desvauxii*. Estudos em que as pétalas estão diretamente associadas à transferência dos grãos de pólen para o corpo do polinizador, aumentando as taxas de polinização entre flores já foram descritos para flores do gênero *Cassia* e *Senna* como um mecanismo de polinização por ricochete, no qual o pólen é ejetado das anteras poricidas para a pétala maior da flor e depositado no corpo do polinizador indiretamente (Westerkamp, 2004; Amorim et al, 2017). Em um estudo de caso com flores de *Chamaecrista ramosa*, os autores verificaram a ocorrência de um mecanismo semelhante em que o pólen percorria as pétalas exercendo um movimento circular em ‘looping’ até chegar ao corpo da abelha (Almeida et al., 2013a).

Detectamos uma preponderância da autopolinização mediada pelas abelhas somada a autopolinização espontânea nas flores pequenas de *C. nictitans*, diferentemente das flores de *C. desvauxii*. A autocompatibilidade foi descrita para diversas espécies do gênero *Chamaecrista*,

no entanto muitas espécies do gênero são dependentes das abelhas para a polinização e formação de frutos, devido à separação espacial entre os poros das anteras e a superfície estigmática que diminui as chances de transferência e deposição do próprio pólen da flor no estigma (Almeida et al. 2013a; Almeida et al. 2013b). Existem registros mais raros de autopolinização espontânea para algumas espécies do gênero *Chamaecrista*, como é o caso da espécie *Chamaecrista serpens* que forma frutos espontaneamente (Urrutia & Hokche, 2008) e *Chamaecrista kunthiana* (observações pessoais). No entanto, *C. nictitans* tem uma taxa expressiva de formação de frutos espontaneamente chegando a 23%, portanto, ela fornece uma segurança reprodutiva à espécie que não depende exclusivamente da interação planta-polinizador para a formação de frutos, diferentemente das flores de *C. desvauxii* var. *latistipula* em que não observamos a formação de frutos espontâneos.

Diferenças no tamanho floral estão diretamente ligadas à mudanças na alocação de recursos, em que a diferenciação na alocação entre os grãos de pólen e óvulos pode refletir sobre a seleção da autofecundação, reduzindo a dependência dessas plantas a polinizadores para sua reprodução, como é o caso de *C. nictitans*. Já as flores maiores em *C. desvauxii* var. *latistipula* aumentam as chances de fertilização entre flores. Além do grau reduzido de hercogamia nas flores pequenas de *C. nictitans* que favorecem a autopolinização, a área do estigma nessa espécie parece aumentar durante a antese, o que não ocorre em *C. desvauxii* var. *latistipula* que tem uma área do estigma menor em flores no final da antese quando comparadas com *C. nictitans*. O aumento do tamanho do estigma em flores menores pode facilitar a capturar de pólen (Vallejo et al, 2014).

Em *C. desvauxii* var. *latistipula*, é necessário que as abelhas visitem as flores para realizar o transporte dos grãos de pólen, promovendo a polinização, assim como em outras espécies do gênero, como *C. desvauxii* var. *latistipula*, *C. desvauxii* var. *graminea*, *C. keyensis*, *C. ramosa* e *C. flexuosa* (Liu & Koptur 2003; Costa et al. 2007; Almeida et al. 2013a; Almeida et al. 2013b). O arranjo das estruturas reprodutivas dentro de uma flor menor, a redução da distância entre as anteras e estigma, e entre morfos das anteras, e a interação dessas flores com abelhas menores, que gastam mais tempo por flor para a retirada dos grãos de pólen, resultam na perda de especialização de *C. nictitans*. Neste caso, todas as abelhas tocam o estigma durante a visita, e podem assim ser consideradas polinizadoras potenciais, aumentando a chance da transferência do pólen da própria flor, um sistema mais generalista, oposto dos visitantes florais e a dinâmica de transferência de pólen de *C. desvauxii* var. *latistipula* (Vallejo-Marín et al, 2009; Vallejo-Marín et al, 2010, Vallejo-Marín et al, 2014). A flor e o tamanho do polinizador afetam diretamente a probabilidade de que as estruturas reprodutivas entrem em contato com o corpo do polinizador, onde está localizada a carga polínica que será transferido para o estigma

(Whalen, 1978). Abelhas pequenas durante as visitas em flores maiores não entram ou raramente entram em contato com as estruturas reprodutivas, devido ao seu tamanho corporal (Laporta 2005; Almeida 2012; Almeida et al. 2013a). Uma abelha pequena, como as espécies *Augochoropsis sp.*; *Dialictus sp.* e *Centris tarsata*, ao visitar uma flor de *C. desvauxii* var. *latistipula* que é relativamente grande, quando comparada a *C. nictitans* não entra em contato com o estigma, mas coleta pólen por vibração, atuando como uma furtadora de pólen (do inglês “thieves”), ao contrário do seu comportamento em *C. nictitans*, como polinizadora. Desta forma, as polinizadoras para *C. desvauxii* var. *latistipula* deve ser grande porte como *Bombus morio*, *Xylocopa sp* e *Eulaema nigrita* ou durante a visita deve se movimentar inúmeras vezes com o *Pseudaugochlora graminea*.

5. Conclusão e perspectivas futuras

Concluindo, nossos resultados indicam que o tamanho floral está associado a diferenças no sistema reprodutivo entre espécies, mas não determina de forma clara a divisão de trabalho entre as anteras. Adicionalmente, o tamanho floral tem forte influência nos grupos de polinizadores e no comportamento dos mesmos durante a realização das visitas. -Flores pequenas de *C. nictitans* parecem ter um sistema mais generalista quando comparado a flores maiores de *C. desvauxii* var. *latistipula*. A morfologia floral de *C. nictitans* embora muito semelhante a *C. desvauxii* var. *latistipula* possui suas peças florais reduzidas em tamanho e, por consequência, existe uma redução ou perda da heteranteria. A maior área estigmática em flores de *C. nictitans* torna-se uma explicação adicional para as diferentes estratégias reprodutiva entre espécies. Devido à separação espacial entre estigma e anteras, ao realizar a visita, o visitante acaba por tocar todas as estruturas reprodutivas em uma só visita em *C. nictitans*, aumentando, assim, a eficiência do sistema de polinização; e é provável que a vibração das anteras porcidas não seja um fator determinante para as flores menores de *C. nictitans* quando comparado a *C. desvauxii* var. *latistipula*, que tem uma separação espacial mais expressiva entre os órgãos da flor.

6. Referências Bibliográficas

- Agostini, A.; Lopes A.V. & Machado, I.C.; 2014. Polinização por abelhas. In: Rech, A.R.; Agostini, K.; Machado, I.C.S. & Oliveira, P.E.A.M. (orgs.). *Biologia da polinização. Projeto Cultural*, Rio de Janeiro. Pp. 206-233
- Almeida, N. M.; castro, C. C.; Leite, A. V.; Novo, R. R. & Machado, I. C. 2013a. Enantiostyly in *Chamaecrista ramosa* (Fabaceae-Caesalpinioideae): floral morphology, pollen transfer dynamics and breeding system. *Plant Biology* 15: 369-375.
- Almeida, N. M.; Castro, C. C.; Leite, A. V.; Novo, R. R. & Machado, I. C. 2013b. Floral polymorphism in *Chamaecrista flexuosa* (Fabaceae-Caesalpinioideae): a possible case of atypical enantiostyly? *Annals of Botany* 112 (6): 1117-1123.
- Almeida, N.M. 2014. Enantiostilia e relações reprodutivas em espécies da subtribo Cassiinae (Fabaceae - Caesalpinioideae) Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Biologia, Recife, 2014.
- Alves-Dos-Santos, I., Silva CI, Pinheiro M, Kleiner AMP. 2016. Quando um visitante floral é um polinizador? *Rodriguésia*, doi: 10.1590/2175-7860201667202.
- Amorim, T. , Marazzi, B., Soares, A. A., Forni-Martins, E. R., Muniz, C. R. , Westerkamp, C. 2017. Ricochet pollination in *Senna* (Fabaceae) – petals deflect pollen jets and promote division of labour among flower structures. *H. Rennenberg Received*: doi:10.1111/plb.12607
- Barrett SCH. 1992. *Evolution and function of heterostyly*. Berlin, Germany: Springer
- Barrett SCH. 2002 Sexual interference of the floral kind. *Heredity* 88, 154 –159. (doi:10.1038/sj.hdy.6800020)
- Bates D., Maechler, M., Bolker, B, Walker, S. 2015. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software*, 67(1), 1-48. doi:10.18637/jss.v067.i01.
- Baumgratz, J.F.A.; Silva, N.M.F. 1986/88. Ecologia da polinização e biologia da reprodução de *Miconia stenostachya* DC. (Melastomataceae). *Rodriguésia* 38/40(64/66): 11-23.
- Bolker. B, Skaug, H and Laake, J. 2017. R2admb: 'ADMB' to R Interface Functions. R package version 0.7.16. <https://CRAN.R-project.org/package=R2admb>
- Buchmann, S.L. 1983. Buzz pollination in angiosperms. In *Handbook of experimental pollination* (C.E. Jones & R.J. Little, eds.). Van Nostrand Reinhold New Your p. 73-113.
- Conceição, A. D. S.; Queiroz, L. P.; Lewis, G. 2001, *Novas espécies de Chamaecrista Moench (leguminosae-caesalpinioideae) da chapada diamantina, Bahia, Brasil. Sitientibus. Série Ciências Biológicas, Feira de Santana, v. 1, n. 2, p. 112-119, 2001.*

- Costa, C.B.N.; Lambert, S.M.; Borba, E.L. & De Queiroz, L.P. 2007. Postzygotic reproductive isolation between sympatric taxa in the *Chamaecrista desvauxii* complex (Leguminosae-Caesalpinioideae). *Annals of Botany* 99: 625–635.
- Cruden, R.W. 1977 Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution*, 4, 32–46
- Dantas M.M., Silva, M.J. 2013. O gênero *Chamaecrista* (Leguminosae, Caesalpinioideae, Cassieae) no Parque Estadual da Serra Dourada, Goiás, Brasil. *Rodriguésia* 64(3): 581-595. 2013
- Darwin C. 1862. The various contrivances by which British and foreign orchids are fertilized by insects. London: Murray.'
- De Luca PA, Vallejo-Marín M. 2013 What's the 'buzz' about? The ecology and evolutionary significance of buzz-pollination. *Curr. Opin. Plant Biol.* 16, 429 –435. (doi:10.1016/j.pbi.2013.05.002)
- Dulberger, R. 1981. The floral biology of *Cassia didymobotrya* and *C. auriculata* (Caesalpinaceae). *American Journal of Botany* 68:1350-1360.
- Endress, P.K. 1994. Diversity and evolutionary biology of tropical flowers. Cambridge University Press, Cambridge.
- Fournier DA, Skaug HJ, Ancheta J, Ianneli J, Magnusson A, Maunder M, Nielsen A and Sibert J .2012. “AD Model Builder: using automatic differentiation for statistical inference of highly parameterized complex nonlinear models.” *Optim. Methods Softw.*, *27*, pp. 233-249.
- Fox, J. & Weisberg, S. 2011. An {R} Companion to Applied Regression, Second Edition. Thousand Oaks CA: Sage. URL: <http://socserv.socsci.mcmaster.ca/jfox/Books/Companion>
- Friedman J, Barrett SCH. 2011 The evolution of ovule number and flower size in wind-pollinated plants. *Am. Nat.* 177, 246 –257. (doi:10.1086/657954)
- Hothorn T., Bretz, F and Westfall, P.2008. Simultaneous Inference in General Parametric Models. *Biometrical Journal* 50(3), 346--363.
- Hrncir M, Gravel AI, Schorkopf DLP, Schmidt VM, Zucchi R, Barth FG. 2008. Thoracic vibrations in stingless bees (*Melipona seminigra*): resonances of the thorax influence vibrations associated with flight but not those associated with sound production. *Journal of Experimental Biology* 211(5): 678-685.
- Jesson LK, Barrett SCH. 2003. The comparative biology of mirror-image flowers. *International Journal of Plant Sciences* 164: S237–S249.

- Laporta, C. 2005. Floral biology and reproductive system of enantiostylous *Senna corymbosa* (Caesalpinaceae). *Revista de Biologia Tropical* 53 (1-2): 49-6
- Lewis, G. P. et al. Legumes of the world. Kew: Royal Botanic Gardens, 2005
- Liu, H & Koptur, S. 2003. Breeding system and pollination of a narrowly endemic herb of the Lower Florida Keys: impacts of the urban–wildland interface. *American Journal of Botany* 90: 1180–1187.
- Lunau, K.; Piorek, V.; Krohn, O.; Pacini, E. 2014. Just spines—mechanical defense of malvaceous pollen against collection by corbiculate bees. *Apidologie* 46: 144—149.
- Luo Z, Zhang D, Renner SS. 2008. Why two kinds of stamens in buzzpollinated flowers? Experimental support for Darwin’s division-oflabour hypothesis. *Functional Ecology* 22: 794–800.
- Luo ZL, Gu L, Zhang DX. 2009. Intrafloral differentiation of stamens in heterantherous flowers. *Journal of Systematics and Evolution* 47: 43– 56
- Luo, Z.; Zhang, D.; Renner, S.S. 2008. Why two kinds of stamens in buzz-pollinated flowers? Experimental support for Darwin’s division-of-labour hypothesis. *Functional Ecology* 22: 794-800.
- Michener, C. D. 1962. Na interesting method of pollen collecting by bees from flowers with tubular anthers. *Review Biology Tropical*, 10,167-175
- Michener, C.D. 2007. *The Bees of the World*, 2nd edn. John Hopkins University Press, Baltimore.
- Morgan, M.T. 2006. Selection on reproductive characters: conceptual foundations and their extension to pollinator interactions In: Harder L.D., Barrett S.C.H. eds. *Ecology and evolution of flowers*
- Müller F. 1883 Two kinds of stamens with diferente functions in the same flower. *Nature* 27, 364 – 365. (doi:10.1038/027364b0)
- Nogueira, A., Valadão-Mendes L.B., El-Ottra JHL., Guimarães E, Cardoso-Gustavon P, Quinalha MM, Paulino JV, Rando JG. 2018. Relationship of floral morphology and development with the pattern of bee visitation in a species with pollen-flowers, *Chamaecrista desvauxii* (Fabaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 1: 1-20.
- Oliveira, P.E., Maruyama P.K. 2014. *Sistemas reprodutivos*. In: Rech AR, Agostini K, Oliveira PE, Machado IC. eds. *Biologia da polinização* Editora: Projeto Cultural, pp.73-92.P.K. 2014. *Sistemas reprodutivos*. In: Rech AR, Agostini K, Oliveira PE, Machado IC. eds. *Biologia da polinização* Editora: Projeto Cultural, pp.73-92.
- Pinheiro J, Bates D, DebRoy S, Sarkar D and R Core Team. 2017. *_nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models_*. R package version 3.1-131, <URL:https://CRAN.R-project.org/package=nlme>.

- Pinheiro, M.; Gaglianone, M.C.; Nunes, C.E.P.; Sigrist, M.R. & Alves-dos-Santos, I 2014. Polinização por abelhas. In: Rech, A.R.; Agostini, K.; Machado, I.C.S. & Oliveira, P.E.A.M. (orgs.). *Biologia da polinização*. Projeto Cultural, Rio de Janeiro. Pp. 206-233
- Pires, J.P.A. & Freitas, L. 2008. Reproductive biology of two tree species of Leguminosae in a Montane Rain Forest in Southeastern Brazil. *Flora* 203: 491-498. *pollination biology* (eds CE Jones, RJ Little), pp. 73 –113. New York, NY: Scientific and Academic
- Queiroz, R.T & Loiola, M.I.B. 2009.O gênero *Chamaecrista* Moench (Caesalpinioideae) em áreas do entorno do Parque Estadual das Dunas de Natal, Rio Grande do Norte, Brasil. *Hoehnea* 36: 725-736.
- R Core Team. 2017. R: A language and environment for statistical computing R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Renner, S.S. 1989. A survey of reproductive biology in Neotropical Melastomataceae and Memecylaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 76:496-518.
- Rstudio. RStudio: Integrated Development Environment for R. RStudio Inc., Boston, MA. <<http://www.rstudio.com>>, 2018.
- Santos, A.K.A.; Martins, A. B.; Romero, R.; Santos, A. P. M.; Almeda, F Bemado, K. F. R.; Koschnitzke, C.; Goldenberg, R.; Reginato, M.; Lee, R. C. S.; William Antonio Rodrigues, W. A. 2009. Melastomataceae. In: Giulietti, A.M. Giulietti, A.M.; Rapini, A.; Andrade, M. J. 8 G.; Queiroz, L. P.; Silva, J. M. C. (eds.) *Plantas raras do Brasil*. Belo Horizonte, MG. Conservação Internacional, Universidade Estadual de Feira de Santana. Pp. 263-279.
- Seavey, S.R. & Bawa, K.S. 1986. Late-acting selfincompatibility in Angiosperms. *Botanical Review* 52: 195-219.
- Solís-Montero L, Vallejo-Marín M. 2017. Does the morphological fit between flowers and pollinators affect pollen deposition? An experimental test in a buzzpollinated species with anther dimorphism. *Ecol Evol.* 2017;7:2706–2715. <https://doi.org/10.1002/ece3.2897>
- Souza, V.C.; Bortoluzzi, R.L.C. 2015 *Chamaecrista* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em:<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB22876>>.em 20/01/2019
- Souza, V.C.; Bortoluzzi, R.L.C. 2015 *Chamaecrista* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em:<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB22876>>.em 20/01/2019
- Urutia, E. & Hokche, O. 2008. Aspectos de la biología reproductiva de dos especies de *Chamaecrista* Moench (Caesalpinioideae – Leguminosae). *Acta bot. Venez.* 31 (2): 461-472.

- Vallejo-Marín M, Solís-Montero L, Souto Vilaros D, Lee MYQ. 2013 Mating system in Mexican populations of the annual herb *Solanum rostratum* Dunal (Solanaceae). *Plant Biol.* 15, 948–954. (doi:10.1111/j.1438-8677.2012.00715.x)
- Vallejo-Marín, M. 2018 In press. Buzz pollination: Studying bee vibrations on flowers. *New Phytologist*. Tansley Insight. doi: 10.1111/nph.15666 Supplementary information: Buzz Pollination Glossary; Shiny App for vibrations
- Vallejo-Marín, M. Walker C, Friston-Reilly P, Solís-Montero L, Iqbal B. 2014. Recurrent modification of floral morphology in heterantherous *Solanum* reveals a parallel shift in reproductive strategy. *Phil. Trans. R. Soc. B* 369: 20130256. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2013.0256>
- Vallejo-Marín, M., Da Silva, E. M., Sargent, R. D., & Barrett, S. C. H. (2010). Trait correlates and functional significance of heteranthy in flowering plants. *New Phytologist*, 188, 418–425.
- Vallejo-Marín, M., Manson J.S., Thomson, J.D., Barrett S.C.H. 2009. Division of labour within flowers: heteranthy, a floral strategy to reconcile contrasting pollen fates. *Journal of Evolutionary Biology* 22: 828–839.
- Varassin, I.G.; Amaral-Neto, L.P. 2014. Atrativos. In: Rech, A. R.; Agostini, K.; Oliveira, P. E.; Machado, I. C. (eds.) *Biologia da Polinização*. Rio de Janeiro: Projeto Cultural. Pp. 151—168.
- Venables, W. N. & Ripley, B. D. 2002 *Modern Applied Statistics with S*. Fourth Edition. Springer, New York. ISBN 0-387-95457-0
- Vogel S. 1978 Evolutionary shifts from reward to deception in pollen flowers. In *The pollination of flowers by insects* (ed. AJ Richards). London, UK: Academic Press.
- Waser, N, Chittka L, Price M, Williams N, and Ollerton J (1996). Generalization in pollination systems, and why it matters. *Ecology*, 77, 1043–60
- Westerkamp C (1996) Pollen in bee-flower relations: some considerations on melittophily. *Bot Acta* 109:325–332
- Westerkamp, C. 2004. Ricochet pollination in *Cassias* – and how bees explain enantiostyly. In: Magalhães FB, Pereira J.O, eds. *Solitary bees: conservation, rearing and management for pollination*. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará.
- Whalen MD. 1978 Reproductive character displacement and floral diversity in *Solanum* section *Androceras*. *Syst. Bot.* 3, 77–86. (doi:10.2307/2418533)
- Wood, S.N. 2017 *Generalized Additive Models: An Introduction with R* (2nd edition). Chapman and Hall/CRC.

Zapata, T.R. & Arroyo, K.M.T. 1978. Plant reproductive ecology of a secondary deciduous tropical forest in Venezuela. *Biotropica* 10: 221-230.

Figuras

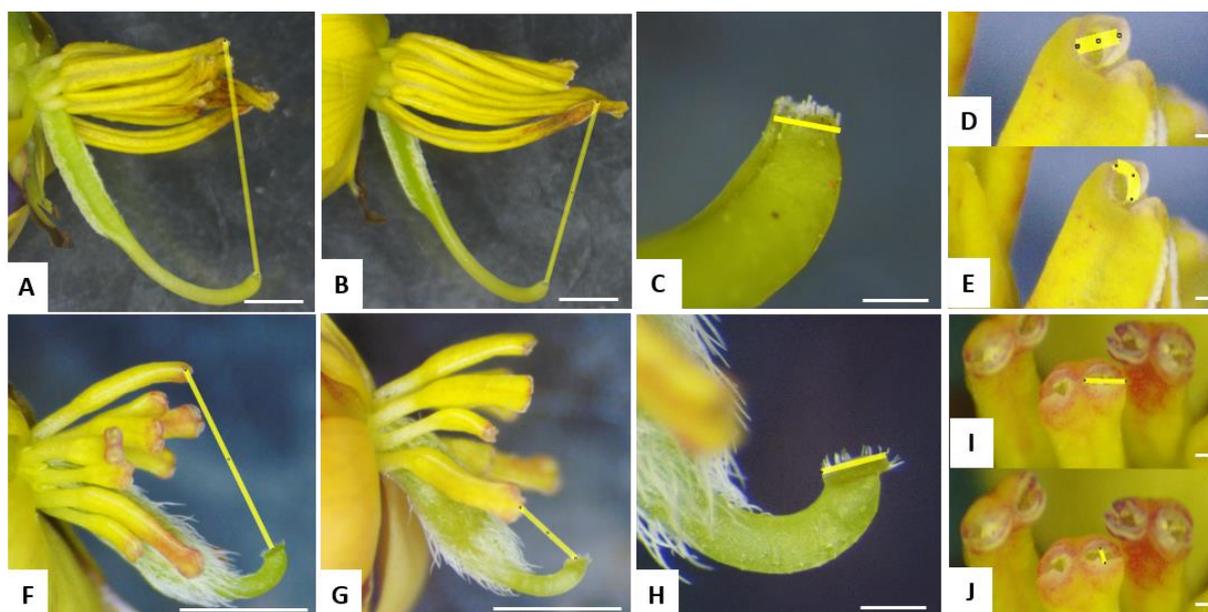


Figura 1: Medidas realizadas em cada flor no programa de imagens ImageJ em *C. desvauxii* var. *latistipula* e *C. nictitans* (Leguminosae). A linha amarela representa as distâncias mensuradas: (a) distância entre o estigma e o ápice da antera mais distante em flores de *C. desvauxii* var. *latistipula*, (b) distância entre o estigma e o ápice da antera mais próxima em flores de *C. desvauxii* var. *latistipula*, (c) diâmetro do estigma em flores de *C. desvauxii* var. *latistipula*, (d) secção máxima do poro da antera *C. desvauxii* var. *latistipula*, (e) secção mínima do poro da antera *C. desvauxii* var. *latistipula*, (f) distância entre o estigma e o ápice da antera mais distante em flores de *C. nictitans*, (g) distância entre o estigma e o ápice da antera mais próxima em flores de *C. nictitans*, (h) diâmetro do estigma de flores de *C. nictitans*, (d) secção máxima do poro da antera *C. nictitans*, (e) secção mínima do poro da antera *C. nictitans*. Escala: Figuras (a,b,g,h – 0,5 mm), (c,h – 0,4 mm) e (d,e,i,j – 0,2 mm).