

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
VEGETAL

ARTHUR DOMINGOS DE MELO

**EVOLUÇÃO NO ESCURO: SELEÇÃO FENOTÍPICA DE ATRIBUTOS
FLORAIS ASSOCIADOS À QUIROPTEROFILIA**

RECIFE
2019

ARTHUR DOMINGOS DE MELO

**EVOLUÇÃO NO ESCURO: SELEÇÃO FENOTÍPICA DE ATRIBUTOS
FLORAIS ASSOCIADOS À QUIROPTEROFILIA**

Tese apresentada à Pós-Graduação em
Biologia Vegetal da Universidade Federal de
Pernambuco como requisito para a obtenção
do título de Doutor em Biologia Vegetal,
Área de concentração: Ecologia

Linha de pesquisa: Ecologia de populações

Orientadora: Prof^a Dr^a Isabel C. S. Machado

Universidade Federal de Pernambuco, Recife – Brasil

Co-orientador: Prof. Dr. Andrea A. Cocucci

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Córdoba – Argentina

RECIFE

2019

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso
(CRB4 1728)

Melo, Arthur Domingos de
Evolução no escuro: seleção fenotípica de atributos florais associados à Quiropterofilia
/ Arthur Domingos de Melo – 2019.

157 f.: il., fig., tab.

Orientadora: Isabel C. S. Machado

Coorientador: Andrea A. Cocucci

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de
Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, 2019.
Inclui referências e anexos.

1. Fertilização de plantas 2. Morcego 3. Caatinga I. Machado, Isabel C. S. (orient.) II.
Cocucci, Andrea A. (coorient.) III. Título

571.8642

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2021-103

ARTHUR DOMINGOS DE MELO

**EVOLUÇÃO NO ESCURO: SELEÇÃO FENÓTIPICA DE ATRIBUTOS
FLORAIS ASSOCIADOS À QUIROPTEROFILIA**

APROVADA EM 22/02/2019

BANCA EXAMINADORA:

Dr^a. Isabel Cristina Machado – UFPE

Dr. Erich Arnold Fischer – UFMG

Dr. Túlio Freitas Figueira de Sá – UFRPE

Dr. Marccus Vinícius da Silva Alves – UFPE

Dr^a. Maria Fabiola Gomes da Silva Barros – UFPE

Às minhas avós Inascia Joseja e Delmira Gertrudes (*in memorian*), pelos seus imensos carinhos e por me propiciarem meus primeiros contatos com as plantas em meio a seus jardins sempre floridos, a partir das quais construí minhas memórias afetivas botânicas.

AGRADECIMENTOS

Essa ~~ciranda~~ tese não é minha só... ela é de todos nós!

Primeiramente, eu sou grato ao fractal do universo e a energia que flui Nele (independente da fé, nome ou devoção a que se refira); eu sou grato por esse mundo, o qual tenho chance de estudar; eu sou grato por existir, Darwin e Dawkins nos apontam como dentro das possibilidades infinitas presentes a partir das combinações de nosso DNA existem bilhões de humanos incríveis que até agora são apenas possibilidades (Nightwish, 2015), eu fico muito feliz de ter a chance de ser real; eu sou grato por estar onde estou, com as pessoas que eu estou; mas mais importante do que tudo isso, eu sou grato por ter consciência de cada uma dessas coisas.

À minha família por ser linda exatamente como ela é. Agradeço aos meus pais Jurandir e Maria do Carmo por todo o apoio que sempre tive na minha formação. Seus cuidados, torcida e subsidios foram fundamentais nesses ultimos anos de pós-graduação. Mesmo sem entender muito bem minhas atividades de campo e o desenvolvimento da pesquisa, sempre estiveram comigo onde quer que eu estivesse. Esse carinho se estende para minha irmã Talita, ser um motivo de orgulho para ela é um dos meus melhores prazeres. Também agradeço o grande carinho e boas energias na forma das orações de minhas avó Inascia e tias, bem como a alegria de meus primos (eu realmente sinto que a torcida de tanta gente querida é responsável por tanta coisa boa que acontece comigo).

À minha orientadora Isabel Machado que me acompanha desde a iniciação científica. Agradeço sua imprescindível orientação científica e subsídios para realização desta tese. Para além disso, agradeço também seu constante brilho, que transborda para seus alunos, nos fortalecendo nessa luta que é a pós-graduação. Muito obrigado pelas valiosas lições sobre autoestima, força e confiança.

À equipe do Laboratório de Biologia Reprodutiva – POLINIZAR. Aos de maior convivência e proximidade, agradeço o contato científico e cada gesto de amizade e gentileza que tornou esses quatro anos mais leves. Em especial, destaco, a professora Dr^a Ariadna Lopes, pelas contribuições e sua parceria nesta tese; Carol, por sua leveza, sensatez, paciência e bons conselhos; Cristina, pela lição de força e vontade de vencer que ela me dá diariamente; Diego e Camila, pela alegria, boas conversas e companheirismo; Luciana por sua amizade e doçura; Márcia, pelo exemplo de operacionalidade e foco; Nando, por ser incrivelmente prestativo e atencioso; Nayara, por seu carinho que abraça; Paulo, por todo o zelo e empenho no desenvolvimento das pesquisas; Sofia, por viver as mais incríveis aventuras em campos

molhados e frios comigo; Ugo, pelo tanto que me ensinou. Sobre os demais membros, aos que já foram eu desejo simpatia do reencontro, para os que ainda vamos conviver fica o convite para estreitar os laços.

Aos parceiros professor Dr. Andrea A. Cocucci e Dr^a Alícia Sersic, cuja a co-orientação e participação nos trabalhos foi fundamental para o desenvolvimento desta tese. Agradeço ainda a acolhida em seu laboratório no Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal, Universidad Nacional de Córdoba, CONICET, Cordoba, Argentina. Obrigado à cada um de seus membros por todo carinho e valiosas trocas de ideias. Estes agradecimentos se estendem também à Paula Cocucci que muito gentilmente me abrigou em sua casa durante a estadia em Córdoba.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal – UFPE pela acolhida durante os últimos anos e empenho da equipe de funcionários, professores e alunos em tornar nosso curso cada vez melhor. Em especial, aos meus colegas de turma e ministrantes das disciplinas cursadas.

Aos meus amigos que em diferentes momentos me deram apoio e me propiciaram os momentos de alegria necessários para retomar as energias para o trabalho.

À Antônio Felix, por iniciar essa jornada da pós-graduação comigo desde o Mestrado. Por ser meu parceiro em/ou causador de algumas de minhas maiores alegrias e de algumas de minhas maiores tristezas também... em uma oscilação com gosto de vida. E por suprir com realce a minha necessidade de um “muso” inspirador.

Demais parceiros e contatos científicos construídos ao longo destes últimos quatro anos, dentre os quais Vinícius Brito e Daniella Navarro, os quais tenho prazer de contar como coautores nos trabalhos desta tese.

Às agências de fomento FACEPE (pela bolsa de doutorado concedida), CNPQ (pelo financiamento do projeto executado). À RPPN Fazenda Almas – PB o PARNA Catimbau e PELD Catimbau pela infra-estrutura para execução das coletas de Campo.

Aos membros da banca, Dr^a. Ana Carolina Galindo, Dr^a Andrea Pedrosa, Dr Erich Fischer, Dr Marciel Oliveira, Dr Marccus Alves, Dr^a Maria Fabiola Barros e Dr Túlio Sá, por aceitarem o convite para contribuir com este trabalho. Agradeço de antemão os conselhos e deixo aqui registrado meu respeito e admiração por todos.

Por fim, sou grato a mim mesmo hahaha... entregar uma tese não é fácil, mas eu estou muito feliz em poder dizer para minha mente e meu corpo (e talvez meu espírito), nós conseguimos!

A ciência não é nem pura nem aplicada. Na sua essência, ela é atravessada pelas ideologias e marcada pelas mentalidades. Ao mesmo tempo, é tributária e geradora das técnicas. Ela é governada por instituições e intervém ao mesmo tempo em suas criações e suas transformações. E é, igualmente, tanto oriunda como inspiradora das demandas sociais.

Pascal Acot, 1988, *apud* Antonio A. J. F. Castro, 1994

RESUMO

A polinização por morcegos é o mais recente sistema de polinização a ter evoluído dentre as angiospermas. Embora estas flores componham uma síndrome de polinização cuja o nível de previsibilidade é um dos maiores, frente a singularidade de seus atributos, muitos deles ainda não foram explorados e a forma como cada um deles evoluiu e está sujeito aos processos de seleção permanece em grande parte desconhecida. Aqui apresentamos um conjunto de abordagens que demonstram como esses atributos florais são integrados entre si, bem como atribuímos-lhes um valor evolutivo ao entender o efeito de sua variação fenotípica. Apresentamos como o principal atrativo primário destas flores, o néctar, pode desempenhar diferentes funções além de recurso, tais como sinalização olfativa, ajuste ao corpo do polinizador e pode sofrer fortes restrições relacionadas à morfologia floral. Propomos e demonstramos como a reflexão ultravioleta desempenha um importante papel de sinalização na polinização por morcego. Assim, abrimos novas perspectivas de interpretação na sinalização floral neste sistema de polinização. Demonstramos como as morfologias irregulares de flores quiropterófilas podem ser compreendidas como fractais, estando essa característica sob processos de seleção fenotípica que favorecem indivíduos com flores com morfologias mais compactas. Nós interpretamos estes resultados à luz da acústica geométrica e bioacústica dos morcegos, o que nos leva a propor um papel de sinalização floral através de disufão sonora. Exemplificamos como diferentes pressões, além dos próprios corpos dos polinizadores, podem estar associadas à processos de seleção fenotípica, tais como manutenção da hercogamia e interferência polínica. Nossos resultados demonstram que morcegos polinizadores podem exercer fortes pressões sobre a seleção de atributos florais. Além disso, alguns atributos ainda não explorados podem resignificar a compreensão de alguns detalhes da interação entre flores e morcegos.

PALAVRAS-CHAVE: ajuste flor-polinizador. ecologia cognitiva da polinização. néctar. polinização por morcegos. sinalização floral.

ABSTRACT

Bat-pollination is the latest pollination system to have evolved in the angiosperms. Although these flowers comprise a pollination syndrome whose level of predictability is one of the largest, in the face of the uniqueness of their attributes, many of them have not yet been explored and the way in which each one has evolved and is subject to selection processes remains largely unknown. Here we present a set of approaches that demonstrate how these floral attributes are integrated. We determine them an evolutionary value by understanding the effect of their phenotypic variation. We present as the main primary attraction of these flowers, nectar, can perform different functions besides resource, such as olfactory signaling, adjustment to the body of the pollinator and may suffer strong restrictions related to floral morphology. We propose and demonstrate how ultraviolet reflection plays an important role of signaling in bat pollination. Thus, we open new perspectives in the floral signaling in this pollination system. We demonstrate how the irregular morphologies of chiropterophilic flowers can be understood as fractals, being this characteristic under phenotypic selection processes that favor individuals with flowers with more compact morphologies. We interpret these results in light of the geometric and bioacoustic acoustics of bats, which leads us to propose a floral signaling role through sound diffusion. We exemplify how different pressures, besides the pollinator bodies themselves, may be associated with phenotypic selection processes, such as maintenance of herkogamy and pollen interference. Our results demonstrate that pollinating bats can exert strong pressure on the selection of floral attributes. In addition, some attributes not yet explored can understate the understanding of some details of the interaction between flowers and bats.

KEY WORDS: bat pollination. flower-pollinator mechanical fit. floral signaling. pollination cognitive ecology. nectar.

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO	11
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	13
3 MANUSCRITO nº1: RESTRIÇÕES DE ACESSO E BAIXA DISPONIBILIDADE DE NÉCTAR RELACIONADAS AO AUMENTO DE FITNESS NA POLINIZAÇÃO POR MORCEGOS EM <i>HARPOCHILUS NEESIANUS</i> (ACANTHACEAE)	32
4 MANUSCRITO nº2: SWEET RAIN”: HYDRAULIC RESTRICTIONS IN BAT POLLINATED FLOWERS.....	51
5 MANUSCRITO nº3: IT'S RAINING FRAGRANT NECTAR IN THE CAATINGA DRY FOREST: AN EVIDENCE OF NECTAR OLFACTORY SIGNALING IN BAT FLOWERS.....	60
6 MANUSCRITO nº4: UV-REFLECTION AS A CUE IN BAT-POLLINATED FLOWERS.....	75
7 MANUSCRITO nº5: SELEÇÃO FENOTÍPICA SOBRE A MORFOLOGIA FRACTAL DE FLORES QUIROPTERÓFILAS: UM TESTE NAS FLORES CONVOLUTAS DE <i>HARPOCHILUS NEESSIANUS</i> NESS (ACANTHACEAE).....	99
8 MANUSCRITO nº6: MORFOLOGIA FLORAL EXTREMA TRANSFERE PÓLEN COM EXCLUSIVIDADE E PRECISÃO NO UROPATÁGIO DE MORCEGOS	125
9 CONCLUSÃO	150
10 ANEXOS	152

1 APRESENTAÇÃO

Esta tese se inicia com uma fundamentação teórica onde são apontadas algumas informações sobre o sistema de polinização por morcegos. Assim, são elencados os diferentes atributos florais que perpassam desde características associadas ao néctar, bem como a sinalização floral e por fim trata dos ajustes morfológicos das flores a estes animais. Além de um breve apanhado sobre o conhecimento vigente acerca deste sistema de polinização, também são apontados algumas novas perspectivas de conhecimento com as quais esta tese visa contribuir.

A seguir são apresentados seis manuscritos, dois deles sob a forma de notas científicas e quatro deles na forma de artigos completos. Cada um dos trabalhos utiliza como modelo diferentes espécies quiropterófilas presentes na Caatinga para responder questões sobre diferentes atributos florais presente neste sistema de polinização. Destacam-se as espécies *Harpochilus neesianus* (Acanthaceae), *Hymenaea cangaceira* e *Calliandra aeschynomoides* (Fabaceae) e *Tarenaya spinosa* (Cleomaceae) a partir das quais foram realizadas as principais abordagens.

O primeiro manuscrito retrata o raro caso de *Harpochilus neesianus* onde a produção de néctar é negativamente afetada pela remoção do mesmo. Esse tipo de condição é incomum e pouco esperada para a polinização por morcegos dados os altos volumes de néctar necessários para suprir as demandas energéticas destes animais. A partir de então, buscamos entender como essa remoção pode afetar tanto o acesso ao recurso, considerando a morfologia floral, quanto a disponibilidade de néctar na população, através de um índice que considera simultaneamente a dinâmica secreção e a variação fenotípica dentro da população. Por fim, determinamos como essa disponibilidade de néctar afeta o fitness tanto masculino, quanto feminino através de medidas de importação e exportação de pólen.

Continuando a explorar características do néctar, nós descrevemos um outro fenômeno a “sweet rain”. Aqui nós descrevemos como diferentes morfologias florais abertas comportam os grandes volumes de néctar associados à polinização por morcegos e como essa descompensação pode acabar gerando o derramamento de néctar. Em uma abordagem experimental, verificamos como a concentração do néctar (atributo capaz de alterar tanto a viscosidade quanto a densidade das gotas de néctar) afeta a capacidade de retenção do mesmo nas flores. Para tanto, utilizamos as espécies *Hymenaea cangaceira* e *Calliandra*

aeschynomoides (Fabaceae) e *Tarenaya spinosa* (Cleomaceae). Em seguida, amostramos as gotas de néctar presentes na população a fim de verificar como se dá esse processo em campo.

Ainda em relação aos atributos do néctar, porém dando início as nossas abordagens envolvendo sinalização floral, o terceiro manuscrito aprofunda-se no impressionante caso de *Hymenaea cangaceria*. Nesta espécie de floração explosiva, não apenas são produzidas grandes quantidades de néctar, como este néctar possui um odor próprio que o distingue tanto de partes vegetativas quanto dos verticilos florais. Esta descrição indica o que pode ser o primeiro estudo que trata de sinalização olfativa no néctar de flores quiropterófilas.

O quarto manuscrito explora pela primeira vez o papel da reflexão Ultra-Violeta na sinalização floral em espécies quiropterófilas. Aqui nós demonstramos como comprimentos de onda na faixa do ultravioleta, aos quais os morcegos são sensíveis, são utilizados na sinalização floral. Este trabalho envolve desde amostragens no nível de comunidade até evidências experimentais, a partir das quais conseguimos comprovar o papel da cor neste sistema de polinização.

Seguindo com as abordagens envolvendo sinalização floral, nós apresentamos o quinto manuscrito que trata da morfologia fractal em flores quiropterófilas. Segundo nossa premissa, tal morfologia pode ter um importante papel na difusão acústica e assim auxiliar na sinalização entre plantas e morcegos. Assim, nós atribuímos um valor evolutivo para tal fractalidade, ao desenvolver um estudo de seleção fenotípica em conjunto com características do néctar e de ajuste morfológico. Nós utilizamos uma população natural de *Harpochilus neesianus* cuja comum morfologia é formada por pétalas enoveladas.

Ainda utilizando como modelo *Harpochilus neesianus*, em nosso último manuscrito desvendamos o peculiar mecanismo de polinização nessa espécie, que deposita grãos de pólen exclusivamente sobre o uropatágio dos morcegos. Nós apresentamos a precisão do sistema através de índices de acurácia e mensuramos a efetividade do sistema. Nesse trabalho, apontamos como a interferência polínica pode ter sido uma pressão evolutiva forte o suficiente para gerar um dramático ajuste morfológico ao corpo dos morcegos.

Por fim, são apresentados três anexos que compreendem um esforço por parte de nossa equipe em popularizar o conhecimento a cerca da polinização, em especial a quiroterofilia. Estes envolvem, um video da apresentação ganhadora do prêmio Euraxess Science Slam Brasil 2018; um episódio do podcast gravado em parceria com a equipe de divulgação científica dos Dragões de Garagem e, por fim, o texto de uma poesia desenvolvida para a apresentação do prêmio Euraxess Science Slam Brasil 2018, classificada no Prêmio Poesia Agora – Primavera 2018.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 POLINIZAÇÃO POR MORCEGOS

A polinização é o processo de transferência de grãos de pólen das anteras de uma flor para um estigma receptivo. Esse processo é frequentemente promovido por animais (polinização biótica), sendo este o caso de aproximadamente 90% das Angiospermas (OLLERTON *et al.*, 2011). Tais animais são ditos polinizadores e ao explorarem recursos presentes nas flores de uma população, promovem o fluxo de pólen. Nesse sentido, flores com polinização biótica precisam oferecer e sinalizar recursos de interesse, bem como adequar-se morfológicamente ao seu corpo destes animais para assegurar a transferência de pólen (ARMBRUSTER, 1998; FENSTER; RODRÍGUEZ, 2007). Estes animais podem ser desde insetos até vertebrados, sendo os últimos representados em sua maioria por aves e morcegos (WILLMER 2011; FISCHER *et al.*, 2014). Dentre os vertebrados nós podemos destacar os morcegos nectarívoros como os mais recentes a terem evoluído, e um dos mais eficientes. Tal eficiência se dá por estes possuem adaptações precisas que lhes permitem explorar com facilidade o recurso presente nas flores (ARMBRUSTER *et al.*, 1998; FENSTER; RODRÍGUEZ 2007). Além disso, eles são conhecidos por sua alta eficiência como polinizadores, realizando visitas frequentes, transportando grandes cargas polínicas e percorrendo grandes distâncias (TRIPP; MANOS 2009; MUCHHALA *et al.*, 2009; MUCHHALA; THOMPSON 2010).

Sugere-se que a polinização por morcegos tenha surgido durante o Eoceno, junto com a diversificação dos vertebrados antófilos e que tenha evoluído de forma independente em diversas famílias de Angiospermas, comumente nas espécies mais derivadas dos clados (FLEMING *et al.*, 2009; FISCHER *et al.*, 2014). Atualmente, sabe-se que esse sistema de polinização está presente em aproximadamente 530 espécies de 250 gêneros em 67 famílias (RENNER 2005; KUNZ *et al.*, 2011). Sua distribuição se dá em todo o globo, ocorrendo de forma particularmente comum em habitats de várzea ao longo dos trópicos e também zonas áridas e subtropicais no Novo Mundo (FLEMING; MUCHHALA 2008). De fato, os neotrópicos concentram a maior parte dos casos de polinização por morcegos (MACHADO; LOPES 1998; FLEMING; MUCHHALA 2008; KUNZ *et al.*, 2011; BUZATTO *et al.*, 2012). Adicionalmente, trabalhos em florestas secas como a Caatinga mostram um grande percentual de plantas quiropterófilas, cerca de 13% (MACHADO; LOPES 2004; QUIRINO; MACHADO 2014; LEAL *et al.*, 2017), muito maior do que geralmente é encontrado em outros tipos

vegetacionais no mundo (MACHADO; LOPES 2004; LEAL *et al.*, 2017). Existem marcadas diferenças nas características das espécies do Novo Mundo (as quais serão abordadas a seguir) em comparação ao Velho Mundo, sendo explicadas pela interação destas flores com morcegos nectarívoros especializados presentes na família Phyllostomidae (FLEMING; MUCHHALA, 2008; FLEMING *et al.*, 2009; FISCHER *et al.*, 2014).

2.2 ESPECIALIZAÇÃO E ATRIBUTOS FLORAIS NA POLINIZAÇÃO POR MORCEGOS

À medida que uma linhagem vegetal adequa-se a um grupo de polinizadores, sua flor consequentemente acaba tornando-se menos atrativa e acessível para outros grupos de animais (FENSTER; RODRÍGUEZ, 2007). Esta condição é chamada de polinização especializada e ocorre em detrimento da polinização generalista, podendo ser analisada sob diferentes perspectivas. Em uma abordagem mais tradicional, é um consenso que flores generalistas são pequenas, claras, com simetria radial e recompensa exposta. Esse aspecto é conhecido como generalização fenotípica e diz respeito principalmente a capacidade de atração e acesso ao recurso e mecanismo de polinização por vários visitantes (OLLERTON *et al.*, 2007). Uma outra abordagem considera a funcionalidade da flor. Neste caso trata-se de especialização funcional, quando o mecanismo de polinização só pode ser acessado por um determinado grupo funcional de polinizadores que esteja incluso em um determinado táxon, ou possua afinidades morfológicas (ARMBRUSTER, 1998; ARMBRUSTER *et al.*, 2000). Por fim, uma terceira abordagem que recebe o nome de especialização ecológica, inspirada sobretudo em métricas de ecologia de comunidades, é considerar o número real de espécies polinizadoras que uma planta tem (ARMBRUSTER *et al.*, 1998; FENSTER; RODRÍGUEZ 2007).

Assim, a polinização por morcegos compreende uma especialização fenotípica intensa, pois distancia-se fortemente do consenso geral sobre flores generalistas (FLEMING 2009). Já em termos funcionais, mesmo quando a polinização por morcegos compõe sistemas mistos (geralmente envolvendo outros vertebrados ou possivelmente insetos diurnos ou noturnos) os morcegos apresentam as maiores eficácias devido suas características funcionais tanto morfológicas quanto etológicas (QUEIROZ *et al.*, 2015; MUCHHALA *et al.*, 2009; MUCHHALA; THOMPSON 2010). Em contrapartida, não há um exato consenso sobre a especialização ecológica na polinização por morcegos, desde que são raros ou imprecisos os registros de plantas que restrinjam o número de possíveis espécies de morcegos polinizadores (MUCHHALA 2006; FISHER *et al.*, 2014).

No Brasil, ocorrem oito gêneros de morcegos nectarívoros em 17 espécies, das quais oito já foram registradas em áreas do Nordeste, próximas ou na Caatinga: *Anoura caudifera*, *A. geoffroy*, *Choeroniscus minor*, *Glossophaga soricina*, *Lionycteris spurrelli*, *Lonchophylla mordax*, *L. inexpectata* e *Xeronycteris vieirai* (REIS *et al.* 2007; MORATELLI; DIAS 2015). Além destas espécies, o número de morcegos polinizadores pode ser ainda maior se considerarmos os morcegos frugívoros ou omnívoros que complementam sua alimentação com recursos florais, desempenhando importante papel na polinização (FISHER *et al.*, 2014). Para estes casos, no Brasil, há alguns exemplos presentes nos gêneros *Artibeus*, *Platyrrhinus*, *Uroderma*, *Mimon*, *Phyllostomus*, *Carollia* e *Sturnira* (REIS *et al.*, 2007).

De fato, tem sido comprovado que relações planta-polinizador são preponderantemente assimétricas, com plantas ou polinizadores especialistas interagindo respectivamente com polinizadores e plantas generalistas (BASCOMPTE *et al.*, 2003; BASCOMPTE *et al.*, 2006; STANG *et al.*, 2007). Este parece ser o caso das flores polinizadas por morcego que, sendo xenógamas e altamente dependentes de seus polinizadores (GRIBEL; GIBBS 2002; RATTO *et al.*, 2018), parecem ter uma forte especialização funcional, embora mantenham-se como generalistas ecológicas (*sensu* OLLERTON *et al.*, 2007).

Na perspectiva das síndromes de polinização, uma abordagem que trata de como a combinação de um conjunto de atributos florais nos permite prever um determinado polinizador (VOGEL 1954; VAN DER PIJL 1961), temos o conceito de quiropterofilia (FAEGRI E PIJL 1979; PROCTOR *et al.*, 1996). Embora com duras críticas recentes (OLLERTON *et al.*, 2009; OLLERTON *et al.*, 2015), as síndromes de polinização, especialmente a quiropterofilia, são uma ferramenta muito importante em biologia floral, se utilizadas de forma correta e com interpretações adequadas unindo uma meticulosa análise da flor a observações empíricas dos polinizadores (VOGEL 2006; ROSAS-GUERREIRO *et al.*, 2014).

Independentemente do corpo teórico acessado, parece haver um consenso sobre a tendência à alta especialização em plantas polinizadas por morcegos, bem como a alta previsibilidade deste sistema a partir do fenótipo floral (FLEMING *et al.*, 2009; FLEMING; MUCHHALA 2008; ROSAS-GUERREIRO *et al.*, 2014). Tais características fenotípicas recebem o nome de Atributos Florais e podem ser classificadas em atrativos primários ou secundários, e de ajuste (RECH *et al.*, 2014). Assim, aqui reconhecemos como nosso objeto de estudo as plantas cujas flores detêm um conjunto de características, descritas a seguir, que

favorecem a interação com morcegos, sendo estes seus únicos ou principais polinizadores, em detrimento de outros visitantes florais que atuam de forma secundária.

2.3 ATRATIVOS FLORAIS

Os recursos e sinais florais são os responsáveis por estimular a visita dos polinizadores à flor. Em geral o recurso é o motivo da busca dos animais pelas flores, assim são ditos atrativos primários, enquanto a sinalização indica a presença de tal recurso e por isso é dita atrativo secundário (FAEGRI; PIJL 1979; VARASSIN; AMARAL-NETO 2014). Enquanto o recurso responde às demandas energéticas e fisiológicas, os sinais estão relacionados à percepção sensorial dos polinizadores e sua cognição (WINTER; HELVERSEN 2004). Desta forma, flores quiropterófilas possuem como principal recurso o néctar e seus sinais envolvem cores claras ou opacas, odor semelhante a frutas fermentadas e capacidade de gerar eco. Estes atributos estão ligados, respectivamente, ao hábito noturno dos morcegos, aos seus ancestrais frugívoros e à capacidade de ecolocalização desses animais (BIEDINGER; BARTHLOTT 1993; KAISER; TOLLSTEN 1995; NASSAR *et al.*, 1997; BESTMANN *et al.*, 1997; HELVERSEN; HELVERSEN 1999; SIMON *et al.*, 2011). Ainda assim, a teoria da sinalização de plantas sugere que um determinado traço floral só pode ser reconhecido como um sinal se transporta uma informação que é percebida por um receptor (no nosso caso polinizador), alterando seu comportamento e, em última instância, aumentando a adequação do remetente. Consequentemente, são necessários testes específicos para determinar se um atributo floral desempenha de fato um papel na sinalização (SCHAEFER *et al.*, 2004).

2.4 RECURSOS FLORAIS

O principal recurso apresentado em flores quiropterófilas é o néctar (FAEGRI; VAN DER PIJL 1979), pois os morcegos procuram e coletam apenas néctar e, raramente, o pólen (FLEMING; MUCHHALA 2008; MUCHHALA; THOMSON 2012), havendo, casos pontuais de consumo de partes florais (TSCHAPKA 2003). O volume e padrão como o néctar é secretado, junto à composição e concentração de açúcar são fundamentais para a relação entre plantas e polinizadores (PACCINI; NEPI 2007). Assim, o néctar das flores quiropterófilas possui tais características adequadas aos morcegos.

Morcegos tem uma alta demanda energética chegando a realizar entre 80 e 100 visitas nas flores em cada noite, assim o volume de néctar é geralmente alto (NASSAR *et al.*, 1997). Pelo mesmo motivo, o padrão de secreção mais comum é a produção contínua ao longo da antese (BOBROWIEC; OLIVEIRA 2012). Em relação à composição, os principais açúcares a compor o néctar são hexoses e sua concentração varia de 9 a 29% (BAKER; BAKER 1990). Alguns poucos registros mostram uma preferência de concentração em um máximo de 30%, o que é explicado pela manutenção de uma baixa viscosidade (relacionada à forma rápida das visitas e forma de captura com a língua) e regulação no balanço hídrico na fisiologia do animal (ROCES *et al.*, 1993).

A maneira como a secreção de néctar interage com a frequência de visitas também pode trazer explicações importantes, sobretudo se relacionada ao funcionamento do restante da flor. Em flores polinizadas por morcegos, é comum que maiores frequências de visitas intensifiquem a dinâmica de produção de néctar (BOBROWIEC; OLIVEIRA 2012) e existem casos de ajuste entre o comportamento dos morcegos e essa dinâmica (FISCHER 1992; MACHADO *et al.*, 2006). Apesar disso, estudos mostrando a repercussão destes mecanismos são inexistentes. É importante considerar, por exemplo, que uma relação estreita entre a secreção de néctar e as fases sexuais pode intensificar o “fitness” de uma das fases (masculina ou feminina) (CRUDEN *et al.*, 1983). Por outro lado, a existência de osmorregulação representa um esforço por parte da planta em manter o recurso com a mesma qualidade durante toda a antese (VEIGA *et al.*, 2012).

2.5 SINALIZAÇÃO FLORAL

2.5.1 SINALIZAÇÃO OLFATIVA

Há muito tempo sabe-se que os morcegos que se alimentam de néctar dependem de cheiros para localizar flores (VOGEL 1958). Esse odor de flores quiropterófilas é geralmente referido como desagradável e sua composição química evoluiu de forma convergente nas plantas de diversos clados compreendendo um grupo de compostos ricos em enxofre (KAISER; TOLLSTEN 1995; BESTMANN *et al.*, 1997). Até agora, estes foram os únicos verdadeiramente testados em ensaios comportamentais: apenas uma vez para 20 compostos, usando apenas duas espécies de morcegos Glossophagineos (HELVERSEN *et al.*, 2000). Tal convergência é um forte indicativo da importância do olfato nos morcegos envolvidos na interação de polinização (KNUDSEN; TOLLSTEN 1995), mas também em grupos frugívoros

próximos (SCHMIDT 1973, 1975, 1984). Ainda assim, outros compostos não necessariamente sulfatados podem ser encontrados em plantas polinizadas por morcegos, embora haja pouco mais de uma dúzia de artigos descrevendo a química de tais buquês de flores.

Um outro curioso aspecto dos odores em flores quiropterófilas diz respeito ao seu local de produção na flor. Existem sugestões de que para além dos verticilos florais, o odor dessas flores pode ser produzido principalmente no néctar. Essa condição tem sido recorrentemente proposta, embora sem testes efetivos (ex: *Irlbachia alata* - MACHADO *et al.*, 1998; *Vriesea* spp. - SAZIMA *et al.*, 1995; *Agave palmeri* - RAGUSO 2004). Essa situação abre precedentes para o entendimento de como este atributo pode estar sendo importante para a evolução destas flores. Sobretudo neste momento quando a biologia da polinização ensaia caminhar para além da análise qualitativa dos compostos florais para entender sua variação quantitativa intraespecífica e a forma como podem estar sujeitos à seleção (ADLER; IRWIN 2012).

2.5.2 SINALIZAÇÃO POR REFLEXÃO ACÚSTICA

A ecolocalização é considerada o sentido mais elaborado nos morcegos, logo é elementar supor que deve ter papel importante na sinalização de flores quiropterófilas, como já foi sugerido por alguns autores (e.g. HELVERSEN *et al.*, 2003; WINTER; HELVERSEN 2004). Esta forma de sinal (ecolocalização) é exclusiva em flores quiropterófilas, não sendo possível sugerir padrões a partir de outros polinizadores e denotando a necessidade de seu estudo de forma muito particular. Assim, apenas recentemente testes empíricos comprovaram sua efetividade e traçaram os principais padrões a garantir o funcionamento de tal estratégia (BALLERI *et al.*, 2009), como por exemplo, chamar atenção dos morcegos, através da amplificação da frequência (HELVENSEN; HELVERSEN 1999; 2003) e posicionar a flor em meio a folhagem com a manutenção de uma mesma frequência de eco frente a diferentes ângulos de emissão (SIMON *et al.*, 2011). Tais estratégias foram comprovados em flores/brácteas com morfologias côncavas, as quais permitem reflexão acústica convergente (SIMON *et al.*, 2011; TSCHAPKA *et al.*, 2006; MURPHY *et al.*, 2006).

Por outro lado, as morfologias de flores polinizadas por morcegos são muito diversas e muitas delas não apresentam os requisitos estruturais necessários para a promoção da reflexão acústica convergente (HELVENSEN *et al.*, 2003; FLEMING *et al.*, 2009; MURPHY *et al.*, 2016). Tal situação deixa em aberto a possibilidade deste tipo de sinalização em grande parte das flores que possuem esse sistema de polinização. Em especial, podemos destacar o caso de

flores ou inflorescências do tipo pincel ou pseudo-pincel que destacam-se pelo grande número de peças (flores, pétalas ou filetes) (FAEGRI; VAN DER PIJL 1979; Fleming *et al.*, 2009). Há ainda espécies cuja as pétalas ou sépalas apresentam-se curvadas formando cachos ou séries de arcos (BUZATO; FRANCO 1992; GRIBEL; GIBBS 2002; VOGEL *et al.*, 2004). Em ambos os casos, a morfologia dessas flores é altamente complexa e pode ser definida como fractal (HALLEY *et al.*, 2004).

2.5.3 SINALIZAÇÃO VISUAL

Embora seja comum existirem predisposições inatas nos polinizadores para atração por determinadas cores, bem como a capacidade de aprender novas associações entre cores e recursos (LUNAU; MAIER 1995), durante muito tempo entendeu-se que a visão era um sentido secundário nos morcegos (WINTER; VON HELVERSEN 2004). Tal situação levava a interpretação de que as cores das flores quiropterófilas não desempenhavam uma função importante na polinização, sendo resquícios de condições ancestrais ou auxiliando apenas no destaque em meio a folhagem (FAEGRI; VAN DER PIJL 1979). Tal teoria foi posta em xeque há pouco mais de uma década com a comprovação experimental de que morcegos nectarívoros tem visão dicromática e enxergam luz nos espectros do verde e do ultra violeta (WINTER *et al.*, 2003; MÜLLER *et al.*, 2009). Essa descoberta ressignificou os registros realizados por BIEDINGER; BARTHLOTT (1993) que demonstraram de forma pontual a reflexão de ultra violeta em flores quiropterófilas. Assim, tornou-se razoável pensar que essa reflexão tenha um papel de sinalização floral neste sistema de polinização. Curiosamente, até então não houve nenhuma consolidação da ocorrência de ultra-violeta em flores quiropterófilas ou mesmo de sua eficácia como sinalização contidões naturais.

2.6 AJUSTE MORFOLÓGICO

Existem vários “insights” sobre ajustes morfológicos entre flores quiropterófilas e os morcegos: i) tamanhos grandes, em resposta aos morcegos estarem entre os maiores polinizadores conhecidos; ii) grande quantidade de grãos de pólen, favorecida pela capacidade de transporte de seus pelos; iii) posição das flores expostas além da vegetação, dado o tipo de vôo; iv) flores sem local para pouso, relacionadas a capacidade de pairar em morcegos neotropicais; v) robustez da corola, frente o comportamento de se chocar contra as flores; vi)

cefálios de algumas Cactaceae que protegem as asas dos morcegos contra os espinhos; vii) um caso de coevolução entre o comprimento da língua e do tubo floral; viii) tubos curtos e campanulados em resposta à angulação dos morcegos durante a aproximação e vôo pairado (FAEGRI; VAN DER PIJL 1979; BARTHLOTT 1988; MUCHHALA 2006; ROCHA *et al.*, 2007; MUCHHALA 2010).

Assim, flores polinizadas por morcegos abarcam diversos tipos florais, com uma aparente recorrência de morfologias campanuladas, em pincel ou de tubos curtos (FAEGRI E VAN DER PIJL 1979). Cada um destes tipos resulta em diferentes formas de contato entre os polinizadores e as estruturas reprodutivas. Nas flores do tipo pincel ou de tubos curtos com muitos estames rodeando seu interior é difícil determinar um local específico de contato com o corpo do morcego. Somam-se a estas, flores do tipo estandarte, goela ou com tubos mais alongados (FISCHER 1992; MACHADO; VOGEL 2004; VOGEL *et al.*, 2004; MACHADO *et al.*, 2006; MUCHHALA 2006). Nestes casos, as estruturas reprodutivas encontram-se em um único ponto específico da flor, descrevendo morfologias esternotribicas ou nototribicas, sendo possível sugerir certo nível de ajuste entre a flor e o visitante (ENDRESS *et al.*, 1994).

Se por um lado, para entender os ajustes morfológicos é importante entender a estrutura da flor, por outro, é fundamental considerar a diversidade de polinizadores aos quais estas flores precisam adequar-se. A morfologia e etologia dos morcegos especializados no consumo de nectar varia, sobretudo no Novo Mundo, onde podem ocupar uma maior diversidade de nichos de polinização (FLEMING; MUCHHALA 2008). Estas variações dizem respeito ao tamanho do corpo, a proporção da mandíbula e ao tamanho da língua, havendo algumas tentativas de relacioná-las aos atributos das flores (FLEMING; MUCHHALA 2008; MUCHHALA 2007). Por outro lado, tais distinções não parecem gerar papéis funcionais tão distintos. Por outro lado, morcegos omnívoros oportunistas, ao contrário das espécies nectarívoras especializadas, não conseguem pairar e nem têm adaptações para sucção do néctar o que modifica fortemente sua forma de interação com a flor (PROCTOR *et al.*, 1996; FISCHER *et al.*, 2014; QUEIROZ *et al.*, 2016), o que pode gerar pressões de seleção distintas caso estes sejam os principais polinizadores de alguma espécie.

Além do ajuste ao corpo e comportamento dos morcegos, a maioria das espécies quiropterófilas está particularmente sujeita ao efeito da interferência polínica dada a grande assimetria entre o número de morcegos nectarívoros em relação as plantas que polinizam (HOWELL 1977; MUCHHALA; THOMSON 2012). Assim, também é muito importante considerar efeitos provenientes deste processo e mesmo do isolamento reprodutivo em espécies

quiropterófilas irmãs ou de morfologias parecidas (MUCHHALA; THOMSON 2012; QUEIROZ *et al.*, 2016).

2.7 PADRÕES DE SELEÇÃO FENOTÍPICA

A quiropterofilia é considerada uma das formas mais eficientes dentre os diferentes sistemas de polinização, de forma que podemos considerar os morcegos como promotores de intensas respostas adaptativas nas plantas com as quais interagem (SAHLEY *et al.*, 1993; TRIPP; MANOS 2009; MUCHHALA *et al.*, 2009; MUCHHALA; THOMPSON 2010).

Quando a variação de uma característica (ou conjunto de características) em uma planta é hereditária e de alguma forma repercute na eficiência da atração e/ou encaixe morfológico com seus polinizadores, isso gera diferentes níveis de *fitness* e estabelece as condições necessárias para a seleção fenotípica mediada por polinizadores (BENITEZ-VIEYRA *et al.*, 2014). Espera-se que esse processo aumente a frequência do fenótipo que melhor interagir com o polinizador, determinando em grande parte como os atributos florais ocorrem em uma população (ARNOLD 1983; LANDE 1983). Assim, como uma forma de atribuir um significado funcional, bem como um valor evolutivo aos diferentes atributos florais é comum testar associações entre fenótipos e diferentes níveis de *fitness* (LANDE; ARNOLD 1983; BENITEZ-VIEYRA *et al.*, 2014). Essas abordagens podem ser testes experimentais (através da manipulação do fenótipo e mensuração dos respectivos *fitness* promovidos - CUARTASDOMÍNGUEZ; MEDEL 2010) ou envolver grandes amostragens no nível populacional (onde é possível inferir sobre processos que ocorrem em campo e mensurar a real variação do fenótipo e as formas como diferentes atributos podem estar integrados – ARNOLD 1983; LANDE 1983; LANDE; ARNOLD 1983). Existem ainda abordagens macroevolutivas que apontam as mudanças dos atributos ao longo das espécies de uma determinada linhagem. Embora elas não retratem necessariamente o processo que conduziu essas modificações, elas permitem fazer valiosas associações entre os fenótipos e diferentes grupos de polinizadores (TRIPP; MANOS 2008; ALCANTARA; LOHMANN 2010; SMITH 2010).

As abordagens que estudam processos de seleção fenotípica na polinização por morcegos estão atualmente restritas a testes experimentais com manipulação do fenótipo floral ou mesmo utilização de flores artificiais. A partir desses estudos foi possível atribuir valores evolutivos e significados funcionais para vários atributos, tais como quantidade de pólen (MUCHHALA; THOMPSON 2010), comprimento e formato de tubos florais (MUCHHALA;

THOMPSON 2009), reflexão acústica (SIMON *et al.*, 2011), emissão de odores (HELVERSEN *et al.*, 2000), ou mesmo a atuação conjunta de diferentes atributos como odor e reflexão acústica simultaneamente (MUCHHALA; SERRANO 2015; GONZALEZ-TERRAZAS *et al.*, 2016). Além disso, há também trabalhos que demonstram marcadas associações entre fenótipos específicos (ex: formatos de corolas e coloração floral) e a polinização por morcegos ao longo de linhagens evolutivas (TRIPP; MANOS 2008; LAGOMARSINO *et al.*, 2017; JOLY *et al.*, 2018). Essas informações são de grande importância e respaldam o conhecimento que temos até hoje sobre como ocorre a polinização por morcegos.

Por outro lado, não existem estudos que mensurem a variação fenotípica, sua integração e seu efeito sobre o *fitness* no nível de população na polinização por morcegos. Alguns motivos que justificam essa situação são os muitos problemas logísticos no estudo da polinização por morcegos em florestas úmidas. Por serem em sua grande maioria árvores de grande porte, epífitas ou trapadeiras, o acesso é bastante limitado. Além disso, a dificuldade de observação durante a noite pode ser um agravante sendo necessário equipamentos específicos para registro e contabilização das visitas dos morcegos. Por fim, essas espécies ocorrem geralmente em baixas densidades, o que pode dificultar o alcance de amostragens satisfatórias (GRIBEL *et al.*, 1999; TSCHAPKA; HELVERSEN 2007; FLEMING; MUCHHALA 2008). É muito importante preencher essa lacuna de conhecimento, uma vez que nos permite vislumbrar como esses atributos são selecionados e mantidos em uma escala microevolutiva. Nesse contexto, as espécies quiropterófilas de Caatinga, são uma excelente oportunidade para elucidar vários destes aspectos apresentados. Seu acesso relativamente fácil, somado a populações relativamente abundantes, facilitam os registros e tornam possíveis experimentos complexos e com grandes amostragens.

Nesse sentido, os estudos apresentados nesta tese levam em conta avanços conceituais incorporando conceitos da seleção sexual em animais trouxe a luz a Teoria do Sinal em Plantas. Dela, parte o conceito de que o sinal é algo que é emitido por um organismo e reconhecido por outro, modificando a interação em favor do aumento do “*fitness*” do organismo emissor (SCHAEFER *et al.*, 2004). Desta forma, em polinização, testar a associação entre sinalização e “*fitness*” reprodutivo é a forma mais efetiva de ratificar o papel de certos atributos como atrativo. É importante também considerar que alguns caracteres podem ser sobrepujados por outros em determinados sistemas, por exemplo com cores sendo mais importantes em alguns casos e odor em outros (MILIAR *et al.*, 1985; SHUTTLEWORTH; JOHNSON 2009). Assim, em cada caso particular é importante elencar sinais que podem ser de fato destacados e associados ao

sucesso reprodutivo. Só assim, é possível formular hipóteses que predigam forma como estes atributos são selecionadas em flores quiropterófilas.

Por fim, considerar a relação do sinal com o recurso apresentado é primordial, uma vez que os morcegos possuem sua cognição bem desenvolvida (WINTER; HELVERSEN 2004). Tal condição intensifica a memorização da associação entre intensidade do sinal e qualidade do recurso ofertado. A existência dessa relação é conhecida como honestidade floral (ARMBRUSTER *et al.*, 2005), e torna-se um parâmetro interessante a ser testado em flores quiropterófilas. Um dos principais exemplos de como esse tipo de processo poderia ocorrer seria a presença de odor no néctar, condição já sugerida para flores quiropterófilas (SAZIMA *et al.*, 1995; MACHADO *et al.*, 1998; RAGUSO 2004).

Em especial na questão do ajuste morfológico, a própria mensuração de como se dá a variação fenotípica em polualções naturais pode trazer a luz questões muito importantes. Assim, é possível considerar métricas que indiquem a precisão do sistema (ARMBRUSTER 2009a; 2009b). Como a polinização por morcegos apresenta uma especialização funcional muito grande, é de se esperar que as flores das espécies quiropterófilas conservem as distintas pressões de seleção ao longo de sua ocorrência, em um padrão coeso entre as distintas populações (THOMPSON 2005; ANDERSON; JOHNSON 2008). É possível ainda que exista a configuração de um equilíbrio armamentista (MOREÍ *et al.*, 2012), ao passo que algumas flores respondam ao acesso dos morcegos demandando maior manobrabilidade de voo ou línguas mais compridas (MUCHHALA 2006).

Sendo a polinização um processo chave na manutenção das comunidades, pois está diretamente atrelada ao “fitness” das espécies vegetais (ENDRESS 1994), que refere-se à produção de descendentes, esta tese trabalho ganha importância prática para a conservação, sobretudo na Caatinga, onde a devastação é considerada intensa (RITO *et al.*, 2017). É importante considerar que a maior parte das plantas polinizadas por morcegos compõem um grupo que ocorre em poucas densidades e que tem requerimentos de floresta madura (LOPES *et al.*, 2009). Além disso, este é o principal sistema de polinização por vertebrados a sofrer com o efeito da fragmentação e distúrbio contínuo (RATTO *et al.*, 2018). Essa tese, portanto, poderá auxiliar na previsão de como se comportaria um conjunto de espécies em um determinado cenário de distúrbio a partir da adequada identificação de seus atributos florais e as perdas na quiropterofauna da região. Essa abordagem garante a escolha de espécies para manejos adequados e facilita a compreensão da distribuição de certos grupos. Por fim, o próprio conhecimento dos distintos processos de seleção tem importância conservacionista se levarmos

em conta que garantir que os mecanismos mais raros e peculiares sejam preservados é uma forma de manutenção da biodiversidade, preservação de história evolutiva e garantia de rotas evolutivas para a biota futura.

2.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, L. S.; IRWIN, R. E. 2012. What you smell is more important than what you see? Natural selection on floral scent. *New Phytologist* 195.3: 510-511.

ALCANTARA, S.,; LOHMANN, L. G. 2010. Evolution of floral morphology and pollination system in Bignoniaceae (Bignoniaceae). *American Journal of Botany*, 97(5, 782-796.;

ANDERSON, B.,; JOHNSON, S. D. 2008. The geographical mosaic of coevolution in a plant–pollinator mutualism. *Evolution: International Journal of Organic Evolution*, 621, 220-225.

ANDRADE, K. V. S. A., RODAL, M. J. N., LUCENA, M. F. A.; GOMES, A. P. S. 2005. Composição florística de um trecho do Parque Nacional do Catimbau, Buíque, Pernambuco – Brasil. *Hoehnea* 31: 337-348.

ARMBRUSTER, W. S., HANSEN, T. F., PÉLABON, C., PÉREZ-BARRALES, R.,; MAAD, J. 2009. The adaptive accuracy of flowers: measurement and microevolutionary patterns. *Annals of Botany*, 103(9, 1529-1545.

ARMBRUSTER, W. S., PÉLABON, C., HANSEN, T. F.,; BOLSTAD, G. H. 2009. Macroevolutionary patterns of pollination accuracy: a comparison of three genera. *New Phytologist*, 183(3, 600-617.

ARMBRUSTER, W. S.,; BALDWIN, B. G. 1998. Switch from specialized to generalized pollination. *Nature*, 394(6694, 632.

ARMBRUSTER, S., FENSTER, C.,; DUDASH, M. 2000. Pollination'principles' revisited: specialization, pollination syndromes, and the evolution of flowers. *The Scandinavian Association for Pollination Ecology Honours Knut Faegri*, 39, 179-200.

ARMBRUSTER, W. S., ANTONSEN, L.,; PÉLABON, C. 2005. Phenotypic selection on *Dalechampia* blossoms: honest signaling affects pollination success. *Ecology* 86.12: 3323-3333.

ARNOLD, S. J. 1983. Morphology, performance and fitness. *American Zoologist*, 232, 347-361.

BAKER, H.G.; BAKER, I. 1990. The predictive value of nectar chemistry to the recognition of pollinator types. *Israel Journal of Botany*, 39:157-166.

BALLERI, A., WOODBRIDGE, K., BAKER, C. J.; HOLDERIED, M. W. 2005. Flower Classification by bats: Radar comparisons. *Aerospace and Electronic Systems Magazine* 24: 4-7.

BARTHLOTT, W. 1988. Über die Systematischen Gliederungen der Cactaceae. Beiträge zur Biologie der Pflanzen 63:17-40.

BASCOMPTE, J., JORDANO, P.; OLESEN, J. M. 2006. Asymmetric coevolutionary networks facilitate biodiversity maintenance. *Science*, 312, 431-433

BENITEZ-VIEYRA, S., MORÉ, M.,; AMORIM, F. 2014. Seleção fenotípica mediada por polinizadores. *Rech, AR; Agostini, K.; Oliveira, PEAM; Machado, IC Biologia da Polinização. Editora Projeto Cultural, Rio de Janeiro. 524p.*

BESTMANN, H. J., WINKLER, L.; HELVERSEN, O. 1997. Headspace analysis of volatile flower scent constituents of bat-pollinated plants. *Phytochemistry* 46.7: 1169-1172.

BIEDINGER N, BARTHLOTT W. 1993. Untersuchungen zur Ultraviolettreflexion von Angiospermenblüten I. Monocotyledoneae. *Tropische und subtropische Pflanzenwelt* 86: 1-122.

BOBROWIEC, P. E. D.; OLIVEIRA, P. E. 2012. Removal effects on nectar production in batpollinated flowers of the Brazilian Cerrado. *Biotropica* 44.1: 1-5.

BRODIE E. D. *et al.* 1995. *Visualizing and quantifying natural selection. Trends in Ecology e Evolution.* 10: 313–318.

SAZIMA, M., BUZATO, S.,; SAZIMA, I. 1999. Bat-pollinated flower assemblages and bat visitors at two Atlantic forest sites in Brazil. *Annals of Botany*, 83(6, 705-712.

BUZATO, S.,; FRANCO, A. L. 1992. Tetrastylis ovalis: a second case of bat-pollinated passionflower (Passifloraceae). *Plant Systematics and Evolution*, 181(3-4, 261-267.

CRUDEN, R. W., HERMANN, S. M.; PETERSON, S. 1983. Patterns of nectar production and plant-pollinator coevolution. 80-125. Bentley, B.; Elias, T. *The Biology of Nectaries*. New York, Columbia University Press.

CUARTAS-DOMÍNGUEZ, M.,; MEDEL, R. 2010. Pollinator-mediated selection and experimental manipulation of the flower phenotype in *Chloraea bletioides*. *Functional Ecology*, 24(6, 1219-1227.

DAFNI, A., KEVAN, P. G.; HUSBAND, B. C. 2005. *Practical pollination biology*. Ontario, Canada.

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

FENSTER, C. B.,; MARTEN-RODRIGUEZ, S. 2007. Reproductive assurance and the evolution of pollination specialization. *International Journal of Plant Sciences*, 1682, 215-228.

FISCHER, E. A. 1992. Foraging of nectarivorous bats on *Bauhinia unguolata*. *Biotropica*, 24, 579-582.

FISCHER, E., ARAUJO, A. C.; GONÇALVES F. 2014. Polinização por vertebrados. *Rech, A. R.; Agostini, K.; Oliveira, P. E.; Machado, I. C. Biologia da Polinização. Rio de Janeiro. Editora Projeto Cultural. 311-326.*

FLEMING, T. H.; MUCHHALA, N. 2008. Nectar-feeding bird and bat niches in two worlds: pantropical comparisons of vertebrate pollination systems. *Journal of Biogeography*, 35, 764-780.

FLEMING, T. H., GEISELMAN, C.; KRESS, W. J. 2009. The evolution of bat pollination: a phylogenetic perspective. *Annals of Botany*, 104, 1017-1043.

GONZALEZ-TERRAZAS, T. P., MARTEL, C., MILET-PINHEIRO, P., AYASSE, M., KALKO, E. K.; TSCHAPKA, M. 2016. Finding flowers in the dark: nectar-feeding bats integrate olfaction and echolocation while foraging for nectar. *Royal Society open science*, 3(8), 160199.

GRIBEL, R., GIBBS, P. E.; QUEIRÓZ, A. L. 1999. Flowering phenology and pollination biology of *Ceiba pentandra* (Bombacaceae) in Central Amazonia. *Journal of Tropical Ecology*, 15(3), 247-263.

GRIBEL, R.; GIBBS, P. E. 2002. High outbreeding as a consequence of selfed ovule mortality and single vector bat pollination in the Amazonian tree *Pseudobombax munguba* (Bombacaceae). *International Journal of Plant Sciences*, 163(6), 1035-1043.

HALLEY, J. M., HARTLEY, S., KALLIMANIS, A. S., KUNIN, W. E., LENNON, J. J.; SGARDELIS, S. P. 2004. Uses and abuses of fractal methodology in ecology. *Ecology Letters*, 7(3), 254-271.

HEISLER, I. L.; DAMUTH, J. 1987. A method for analyzing selection in hierarchically structured populations. *The American Naturalist*. 130: 582–602.

HELVERSEN, D.; HELVERSEN, O. 1999. Acoustic guide in bat-pollinated flower. *Nature* 398: 759-760.

HELVERSEN, D.; HELVERSEN, O. 2003. Object recognition by echolocation: a nectar-feeding bat exploiting the flowers of a rain forest vine. *Journal of Comparative Physiology*.189.5: 327-336.

HELVERSEN, O., WINKLER, L.; BESTMANN, H. J. 2000. Sulphur-containing “perfumes” attract flower-visiting bats. *Journal of Comparative Physiology* 186.2: 143-153.

HOLDERIED, M. W.; HELVERSEN, O. 2003. Echolocation range and wingbeat period match in aerial-hawking bats. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 270.1530: 2293-2299.

HOWELL, D. J. 1977. Time sharing and body partitioning in bat–plant pollination systems. *Nature*, 270(5637), 509.

JOLY, S., LAMBERT, F., ALEXANDRE, H., CLAVEL, J., LÉVEILLÉ-BOURRET, É.; CLARK, J. L. 2018. Greater pollination generalization is not associated with reduced constraints on corolla shape in Antillean plants. *Evolution*, 722, 244-260.

KAISER, R.; TOLLSTEN, L. 1995. An introduction to the scent of cacti. *Flavour and Fragrance Journal* 10.3: 153-164.

KNUDSEN, J. T.; TOLLSTEN, L. 1995. Floral scent in bat-pollinated plants: a case of convergent evolution. *Botanical Journal of the Linnean Society* 119.1: 45-57.

- LAGOMARSINO, L. P., FORRESTEL, E. J., MUCHHALA, N.,; DAVIS, C. C. 2017. Repeated evolution of vertebrate pollination syndromes in a recently diverged Andean plant clade. *Evolution*, 71(8, 1970-1985.
- LANDE, R.; ARNOLD, S. J. 1983. The measurements of selection on correlated traits. *Evolution* 37: 1210–1226.
- LEAL, I. R., LOPES, A. V., MACHADO, I. C.,; TABARELLI, M. 2017. Plant–Animal Interactions in the Caatinga: Overview and Perspectives. In *Caatinga* (pp. 255-278. Springer, Cham.
- LOPES, A. V., GIRÃO, L. C., SANTOS, B. A., PERES, C. A.,; TABARELLI, M. 2009. Longterm erosion of tree reproductive trait diversity in edge-dominated Atlantic forest fragments. *Biological Conservation*, 142(6, 1154-1165.
- LUNAU, K.; MAIER, E. J. 1995. Innate colour preferences of flower visitors. *Journal of Comparative Physiology* 177:1–19.
- MACHADO, I. C.; LOPES, A.V. 2004. Floral traits and pollination systems in the Caatinga, a brazilian tropical dry forest. *Annals of Botany* 94: 365-376.
- MACHADO, I. C., LOPES, A. V., LEITE, A. V.; NEVES, C. B. 2006. *Cleome spinosa* (Capparaceae): polygamodioecy and pollination by bats in urban and Caatinga areas, northeastern Brazil. *Botanische Jahrbücher* 127.1: 69-82.
- MACHADO, I. C. S., SAZIMA, I.,; SAZIMA, M. 1998. Bat pollination of the terrestrial herb *Irlbachia alata* (Gentianaceae) in northeastern Brazil. *Plant Systematics and Evolution*, 209(3-4, 231-237.
- MILIAR, R. S., TAMM, S., SUTHERLAND, G. D.; GASS, C. L. 1985. Cues for orientation in hummingbird foraging: color and position. *Canadian Journal of Zoology* 63.1: 18-21.
- MORAN, M. D. 2003. Arguments for rejecting the sequential Bonferroni in ecological studies. *Oikos* 100: 403–405.
- MORATELLI, R.,; DIAS, D. 2015. A new species of nectar-feeding bat, genus *Lonchophylla*, from the Caatinga of Brazil (Chiroptera, Phyllostomidae). *ZooKeys*, (514, 73.
- MORÉ, M., AMORIM, F. W., BENITEZ-VIEYRA, S., MEDINA, A. M., SAZIMA, M.,; COCUCCI, A. A. 2012. Armament imbalances: match and mismatch in plant-pollinator traits of highly specialized long-spurred orchids. *Plos One*, 7, e41878.
- MUCHHALA, N.; THOMSON, J. D. 2010. Fur versus feathers: Pollen delivery by bats and hummingbirds and consequences for pollen production. *The American Naturalist* 175.6: 717-726.
- MUCHHALA, N. 2006. Nectar bat stows huge tongue in its rib cage. *Nature* 444.7120: 701-702.
- MUCHHALA, N. 2007. Adaptive trade-off in floral morphology mediates specialization for flowers pollinated by bats and hummingbirds. *The American Naturalist* 169.4: 494-504.
- MUCHHALA, N.,; SERRANO, D. 2015. The complexity of background clutter affects nectar bat use of flower odor and shape cues. *PloS one*, 1010, e0136657.

- MUCHHALA, N.,; THOMSON, J. D. 2009. Going to great lengths: selection for long corolla tubes in an extremely specialized bat–flower mutualism. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, rspb-2009.
- MUCHHALA, N.,; THOMSON, J. D. 2010. Fur versus feathers: pollen delivery by bats and hummingbirds and consequences for pollen production. *The American Naturalist*, 175(6, 717-726.
- MUCHHALA, N.,; THOMSON, J. D. 2012. Interspecific competition in pollination systems: costs to male fitness via pollen misplacement. *Functional Ecology*, 262, 476-482.
- MÜLLER, B., GLÖSMANN, P., PEICHL, L., KNOP, G. C., HAGEMANN, C.;
AMMERMÜLLER, J. 2009. Bat eyes have ultraviolet-sensitive cone photoreceptors. *PLoS One* 47: e6390.
- NASSAR, J., RAMIREZ. N.; LINARES, O. 1997. Comparative pollination biology of Venezuelan columnar cacti and the role of nectar-feeding bats in their sexual reproduction. *American Journal of Botany* 84.7: 918-918.
- NATTERO, J., COCUCCI A. A.,; MEDEL, R. 2010. Pollinator-mediated selection in a specialized pollination system: matches and mismatches across populations. *Journal of Evolutionary Biology* 23.9: 1957-1968.
- NATTERO, J., SÉRSIC, A. N.; COCUCCI A. A. 2010. Patterns of contemporary phenotypic selection and flower integration in the hummingbird-pollinated *Nicotiana glauca* between populations with different flower–pollinator combinations. *Oikos* 119.5: 852-863.
- OLLERTON, J., KILLICK, A., LAMBORN, E., WATTS, S.,; WHISTON, M. 2007. Multiple meanings and modes: on the many ways to be a generalist flower. *Taxon*, 56(3, 717-728.
- OLLERTON, J., ALARCÓN, R., WASER, N. M., PRICE, M. V., WATTS, S., CRANMER, L., ...; ROTENBERRY, J. 2009. A global test of the pollination syndrome hypothesis. *Annals of botany*, 103(9, 1471-1480.
- OLLERTON, J., WINFREE, R.,; TARRANT, S. 2011. How many flowering plants are pollinated by animals?. *Oikos*, 120(3, 321-326.
- OLLERTON, J., RECH, A. R., WASER, N. M.,; PRICE, M. V. 2015. Using the literature to test pollination syndromes---some methodological cautions.
- OLLERTON, J., ALARCÓN, R., WASER, N. M., PRICE, M.V., WATTS, S., CRANMER, L., HINGSTON, A., PETER, C. I.; ROTENBERRY, J. 2009. A global test of the pollination syndrome hypothesis. *Annals of Botany*, 103, 1471-1480.
- PACINI, E.; NEPI, M. 2007. Nectar production and presentation. *Nectaries and nectar*. Springer Netherlands.167-214.
- PIJL, L. 1961. Ecological aspects of flower evolution. II. Zoophilous flower classes. *Evolution*, 15, 44-59.

PROCTOR, M., YEO, P.; LACK, A. 1996. The natural history of pollination. Portland, Timber Press.

QUEIROZ, J. A., QUIRINO, Z. G. M., LOPES, A. V.,; MACHADO, I. C. 2016. Vertebrate mixed pollination system in *Encholirium spectabile*: a bromeliad pollinated by bats, opossum and hummingbirds in a tropical dry forest. *Journal of Arid Environments*, 125, 21-30.

QUEIROZ, J. A., QUIRINO, Z. G.,; MACHADO, I. C. 2015. Floral traits driving reproductive isolation of two co-flowering taxa that share vertebrate pollinators. *AoB Plants*, 7.

QUIRINO, Z. G. M.; MACHADO, I. C. 2014. Pollination syndromes in a Caatinga plant community in northeastern Brazil: seasonal availability of floral resources in different plant growth habits. *Brazilian Journal of Biology* 74: 62-71.

RAGUSO, R. A. 2004. Why are some floral nectars scented?. *Ecology*, 85(6, 1486-1494.

RATTO F, SIMMONS BI, SPAKE R, ET AL. 2018. Global importance of vertebrate pollinators for plant reproductive success: a meta-analysis. *Front Ecol Environ* 16:82–90. doi: 10.1002/fee.1763

REIS, N. R., PERACCHI, A. L., PEDRO, W. A.,; DE LIMA, I. P. 2007. Morcegos do Brasil. Universidade Estadual de Londrina. Benitez-Vieyra.

RENNER, S. S. 2005. Rewardless flowers in the angiosperms and the role of insect cognition in their evolution. Waser, N.M.; Ollerton J., *Plant–Pollinator Interactions: From Specialization to Generalization*, University of Chicago Press. 123–144.

RITO, K. F., ARROYO-RODRÍGUEZ, V., QUEIROZ, R. T., LEAL, I. R.,; TABARELLI, M. 2017. Precipitation mediates the effect of human disturbance on the Brazilian Caatinga vegetation. *Journal of Ecology*, 105(3, 828-838.

ROCES, F., WINTER, Y.; HELVERSEN, O. 1993. Nectar concentration preference and water balance in a flower visiting bat, *Glossophaga soricina antillarum*. *Animal plant interactions in tropical environments*.

ROCHA, E. A., MACHADO, I. C.; ZAPPI, D. C. 2007. Floral biology of *Pilosocereus tuberculatus* (Werderm.) Byles; Rowley: a bat pollinated cactus endemic from the “Caatinga” in northeastern Brazil. *Bradleya* 25.1: 129-160.

RODAL, M. J. N., ANDRADE, K. V. A., SALES, M. F.; GOMES, A. P. S. 1998. Fitossociologia do componente lenhoso de um refúgio vegetal no município de Buíque, Pernambuco. *Revista Brasileira de Biologia* 58(3: 517-526.

ROSAS-GUERRERO, V., AGUILAR, R., MARTÍN-RODRÍGUEZ, S., ASHWORTH, L., LOPEZARAIZA-MIKEL, M., BASTIDA, J. M.; QUESADA, M. 2014. A quantitative review of pollination syndromes: do floral traits predict effective pollinators? *Ecology letters* 17.3: 388-400.

SAZIMA, M., BUZATO, S.,; SAZIMA, I. 1995. Polinização de *Vriesea* por morcegos no sudeste brasileiro. *Bromélia*, 2(4, 29-37.

SCHAEFER, H. M., SCHAEFER, V.; LEVEY, D. J. 2004. How plant–animal interactions signal new insights in communication. *Trends in Ecology; Evolution* 19.11: 577-584.

SCHLUTER D.; NYCHKA D. 1994. Exploring fitness surface. *The American Naturalist* 143: 597–616.

SCHMIDT, U. 1973. Olfactory threshold and odour discrimination of the vampire bat (*Desmodus rotundus*). *Periodicum biologorum* 75: 89-92.

SCHMIDT, U. 1975. Vergleichende Riechschwellen-bestimmungen bei neotropischen Chiropteren. *Z SaEugetierkd* 40: 269-298.

SCHMIDT, U. 1984. The bats: order Chiroptera. Brown, R. E.; MacDonald, D. W. Social odours in mammals. I. Clarendon Press Oxford.

SHUTTLEWORTH, A.; JOHNSON, S. D. 2009. The importance of scent and nectar filters in a specialized wasp-pollination system. *Functional Ecology* 23.5: 931-940.

STANG, M., KLINKHAMER, P. G.,; VAN DER MEIJDEN, E. 2007. Asymmetric specialization and extinction risk in plant–flower visitor webs: a matter of morphology or abundance?. *Oecologia*, 151(3, 442-453.

THOMPSON, J. N.. 2005. *The geographic mosaic of coevolution*. Univ. of Chicago Press.

THOMPSON, J. N., LAINE, A. L.,; THOMPSON, J. F. 2010. Retention of mutualism in a geographically diverging interaction. *Ecology letters*, 1311, 1368-1377.

TRIPP, E. A.,; MANOS, P. S. 2008. Is floral specialization an evolutionary dead-end? Pollination system transitions in *Ruellia* (Acanthaceae). *Evolution: International Journal of Organic Evolution*, 62(7, 1712-1737.

TSCHAPKA, M. 2003. Pollination of the understorey palm *Calyptrogyne ghiesbreghtiana* by hovering and perching bats. *Biological Journal of the Linnean Society*, 802, 281-288.

TSCHAPKA, M., DRESSLER, S.; HELVERSEN, O. 2006. Bat visits to *Marcgravia pittieri* and notes on the inflorescence diversity within the genus *Marcgravia* (Marcgraviaceae). *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 201.5: 383-388.

VARASSIN, I. G. ; AMARAL-NETO, L. P. 2014. Atrativos. 151-170. Rech, A. R.; Agostini, K.; Oliveira, P. E.; Machado, I. C. *Biologia da Polinização*. Rio de Janeiro Editora Projeto Cultural.

VEIGA, T. B., GALETTO, L.; MACHADO, I. C. 2013. Nectar regulation in *Euphorbia tithymaloides* L., a hummingbird-pollinated Euphorbiaceae. *Plant Biology*, 15, 910-918.

VOGEL, S. 1954. Blütenbiologische Typen als Elemente der Sippengliederung, dargestellt anhand der Flora Südafrikas. *Botanische Studien*, 1, 1-338.

VOGEL, S. 2006. Floral syndromes: empiricism versus typology. *Botanische Jahrbücher* 127.1: 5-11.

VOGEL, S., MACHADO, I. C.; LOPES, A. V. 2004. *Harpochilus neesianus* and other novel cases of chiropterophily in neotropical Acanthaceae. *Taxon* 53.1: 55-60.

WILLMER, P. 2011. *Pollination and floral ecology*. Princeton University Press.

WINTER, Y.; HELVERSEN, O. 2001. Bats as pollinators: foraging energetic and floral adaptations. 148-170. Chittka, L.; Thomson, J. D. Cognitive ecology of pollination: animal behaviour and floral evolution. Cambridge, Cambridge University Press.

WINTER, Y., LÓPEZ, J.; HELVERSEN, O. 2003. Ultraviolet vision in a bat. *Nature* 425: 612614.

3 MANUSCRITO n°1: RESTRIÇÕES DE ACESSO E BAIXA DISPONIBILIDADE DE NÉCTAR RELACIONADAS AO AUMENTO DE FITNESS NA POLINIZAÇÃO POR MORCEGOS EM *HARPOCHILUS NEESIANUS* (ACANTHACEAE)

(A ser enviado para a revista Journal of Plant Ecology)

Arthur Domingos-Melo^{1*}, Andrea A. Cocucci², Isabel Cristina Machado¹

¹Department of Botany, Federal University of Pernambuco, Recife - PE, Brazil

³Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal, Universidad Nacional de Córdoba, CONICET, Cordoba , Argentina

*Correspondence author (arthurdom.melo@gmail.com).

ABSTRACT

A disponibilidade de néctar é uma demanda fundamental para os sistemas de polinização, podendo funcionar tanto como atrativo quanto influenciar no ajuste plantapolinizador. Dadas as peculiaridades da polinização por morcego, esses processos podem ser refletidos de forma particular na transferência de pólen. Aqui nós apresentamos o emblemático caso de *Harpochilus neesianus* (Acanthaceae) um arbusto quiropterófilo de Caatinga para o qual analisamos o néctar quanto a dinâmica e efeito de remoção, forma de apresentação, disponibilidade na população e efeitos nos componentes masculino e feminino do fitness. Nossos resultados revelam um incomum caso de efeito negativo de remoção de néctar em uma planta polinizada por morcegos. Embora o néctar esteja a uma curta distância da entrada do tubo floral, os filetes funcionam como uma barreira restringindo o acesso. A disponibilidade do néctar na população oscilou ao longo do período de antese, porém menores disponibilidades tiveram um efeito positivo no fitness tanto masculino como feminino. *H. neesianus* não necessita sustentar uma alta produção de néctar para obter valores ótimos de fitness, desafiando o senso comum sobre a polinização por morcegos. Processos como os que retratamos aqui podem ter fortes impactos na forma como características do néctar de flores quiropterófilas estão sujeitas à seleção fenotípica.

PALAVRAS-CHAVE:

Caatinga; dinâmica de néctar; fitness; polinização por morcegos; tubo floral.

INTRODUÇÃO

Animais polinizadores necessitam que o recurso das flores que consomem seja capaz de suprir suas demandas energéticas (Brown *et al.* 1978; Haslett 1989; Plowright *et al.* 1999). Consequentemente, a disponibilidade de néctar é um requerimento fundamental nos sistemas de polinização alcançado pelas plantas através de diversos modos. Ajustes maiores envolvem sobreposições ou partilhas temporais e espaciais no número de espécies florindo na comunidade, número de plantas em floração nas respectivas populações e montante de flores produzidas por indivíduo (Potts *et al.* 2004; McKinney *et al.* 2012; Quirino & Machado 2014). Já ajustes mais refinados podem ocorrer ao longo da própria antese floral e estão associados ao volume do néctar produzido por cada flor, à dinâmica de secreção das mesmas e como ela podem ser influenciada pelo consumo por parte dos visitantes ou condições climáticas (Paccini & Nepi 2007). Todos esses processos repercutem em diferentes níveis na fidelização de polinizadores (Haslett 1989; Gowda *et al.* 2012). Como resultado, fitness reprodutivo acaba sendo modulado pela forma como a manutenção da atratividade da flor influencia a frequência de visitas (Rodríguez-Robles *et al.* 1992; Tschapka & Von Helversen 2007; Rocha *et al.* 2007) e sobre como a forma de apresentação do néctar otimiza o encaixe do corpo dos polinizadores à morfologia floral (Harder 1986; Plowright 1987).

Os morcegos antófilos registram as maiores demandas energéticas dentre os polinizadores, ao passo que possuem restrições biomecânicas à sucção de líquidos viscosos (Helversen & Reyer 1984; Roces *et al.* 1993). Consequentemente, as plantas polinizadas por esses animais têm as flores com os maiores volumes de néctar registrados, embora suas concentrações de açúcar sejam limitadas a valores baixos (Willmer 2011). Nesse sentido, morcegos precisam realizar muitas visitas às flores para atingir valores adequados de consumo de carboidratos, ao passo que as flores se esforçam em manter uma alta disponibilidade de néctar ao longo da antese (Helversen & Reyer 1984; Bobrowiec & Oliveira 2012). Ao mesmo tempo, considerando sua condição noturna, estas flores estão menos sujeitas a efeitos de condições climáticas, como a evaporação (Paccini & Nepi 2007). Como resultado, estas flores estão particularmente sujeitas ao comportamento de visita desses animais modular a quantidade de néctar secretado. Assim, flores polinizadas por morcegos podem não ser afetadas pela remoção de néctar (Queiroz *et al.* 2016; Bobrowiec & Oliveira 2012; Dias, 2017), ou responder a elas. Tal resposta pode ser negativa, secretando néctar abaixo do esperado (Cruz-Neto *et al.* 2015)

ou positiva, intensificando a secreção, sendo esta última uma condição sugerida como a mais comum (Petit & Freeman 1997; Bobrowiec & Oliveira 2012; Cruz-Neto et al. 2015).

Sabe-se que a morfologia de focinhos e línguas de morcegos nectarívoros estão relacionados com os tubos florais, nos quais restrições na maneira como o néctar é apresentado podem otimizar o contato do animal com as estruturas reprodutivas (Muchhala & Thomson, 2009; Gonzalez-Terrazas *et al.* 2012). Por outro lado, a real pressão exercida por polinizadores não se dá exatamente sobre o comprimento dos tubos, mas sim na profundidade do néctar (Moré *et al.* 2012). Assim, a quantidade de néctar disponível também poderia funcionar como um atributo de ajuste mecânico, ao afetar a profundidade que a língua do morcego precisa alcançar. Como resultado, flores devem conciliar a disponibilidade de recursos, com restrições na forma como o mesmo é apresentado.

Apesar do conhecimento de todos esses fatores acima, a interação sinérgica dos mesmos permanece desconhecida. O néctar é um dos atributos mais determinantes do sucesso reprodutivo para sistemas de polinização em geral, estando sujeito a fortes processos de seleção fenotípica (Mitchell *et al.* 1998; Benitez-Vieyra 2010; Kulbaba & Worley 2012; Moré *et al.* 2012). Por ser um atributo dinâmico (Paccini & Nepi 2007) é razoável supor que essas pressões variem ao longo da antese. Na polinização por morcegos, tais oscilações devem ser particularmente expressas na exportação e importação de pólen, pois a capacidade de arraste de pólen por parte dos pelos destes animais permite uma relação consistente entre visitação e transporte de pólen (Muchhala & Thomson 2010).

Neste trabalho, nós exploramos como esses processos ocorrem em *Harpochilus neesianus* (Acanthaceae), um arbusto endêmico de Caatinga polinizado por morcegos (Vogel *et al.* 2005). Nós analisamos sua dinâmica de secreção de néctar ao longo da antese e verificamos a existência de efeitos de remoção. Nós também analisamos a forma como o néctar é apresentado ao descrever a morfologia interna do tubo floral e correlacionar volume e variáveis estereométricas florais. Por fim, integramos essas informações em um índice que foi utilizado para verificar o efeito da disponibilidade do néctar no fitness masculino e feminino das flores.

MATERIAL E MÉTODOS

Dinâmica de néctar e efeito de remoção

Para determinar a dinâmica de secreção de néctar de *H. neesianus*, bem como o efeito do consumo, nós realizamos coletas sistemáticas de néctar na população ao longo da antese. As

características do néctar que mensuramos foram: o volume e a concentração de açúcares, além da estimarmos a massa de açúcares a partir destes valores. Para tanto, utilizamos respectivamente micro-seringas (Hamilton®, NV, USA - 25 and 50 µL), refratômetros de bolso (Atago®, Tokyo, Japan - 0–50%) e a equação proposta por Bolten *et al.* (1979) e Galetto e Bernardello (2005). Tomamos essas medidas em intervalos de 2:00 h durante todo o período de antese (18:00, 20:00, 22:00, 00:00 e 2:00 h) para dois tratamentos: i) remoção pontual de néctar e ii) remoção contínua. Para a remoção pontual, nós coletamos o néctar de um novo conjunto de flores em cada intervalo. Para a remoção contínua, um conjunto de flores recebeu sucessivas remoções após a primeira remoção do néctar (adaptado de Wanderley *et al.* 2014). Realizamos a amostragem a partir de um conjunto de 30 indivíduos, sendo utilizadas uma flor por indivíduo a cada horário nos diferentes tratamentos.

Para verificar os efeitos do tempo ao longo da antese e da remoção de néctar sobre o padrão de secreção nós utilizamos modelos mistos lineares generalizados (Bates *et al.* 2014). Nós construímos diferentes modelos, cada um deles considerando um atributo mensurado no néctar como variável dependente. Em todos os modelos os indivíduos foram colocados como fatores randômicos, já o horário de antese, o tratamento e a interação entre ambos foram colocados como fatores fixos. A significância destes modelos foi obtida através verificando a verossimilhança presente na comparação com modelos nulos excluindo o fator de interesse.

Acesso ao néctar

Nós analisamos a morfologia interna do tubo floral de *H. neesianus* a fim de determinar como se dá o acesso ao néctar. Era de nosso particular interesse estimar a altura ocupada pelo néctar dentro do tubo floral, bem como a distância para acessá-lo a partir da abertura do tubo. Para isso, foi necessário coletar dados em duas etapas: análise estereométrica e registro da produção total de néctar.

A primeira etapa consistiu em estimarmos a capacidade volumétrica do tubo floral. O tubo floral de *H. neesianus* tem o formato aproximado a um cilindro (Vogel *et al.* 2005) cujo volume pode ser calculado por $v = \pi \cdot r^2 \cdot h$, onde v =volume, r =raio e h =altura (adaptado de McPherson & Rowntree 1988). Assim, mensuramos a largura do tubo (o qual dividimos por dois para obtermos o raio) e o comprimento do tubo (o qual consideramos como altura); realizamos estas medidas a partir de fotos com escala em vista lateral da flor. Nós utilizamos um total de 100 indivíduos, cada um deles amostrado por três flores. A segunda etapa envolveu mensurar o volume total de néctar secretado para os mesmos 100 indivíduos, a partir de outras três flores. Para tanto, as flores foram ensacadas em pré-antese e seu néctar coletado ao final da

noite. As flores tiveram seus tubos presos ao receptáculo por fita adesiva, evitando qualquer derramamento de néctar, mesmo que houvesse abscisão da corola durante a madrugada.

Munidos destes dados, nós verificamos a conservação do fenótipo dentro de cada planta através de testes de Correlação de Pearson entre pares de flores ao longo dos diferentes indivíduos. A partir de então, para os cálculos seguintes nós utilizamos as médias de cada característica por indivíduo: testamos se havia correlação entre o volume do néctar e a capacidade volumétrica do tubo floral; aplicamos o raio, a capacidade volumétrica do tubo e volume do néctar na fórmula do cilindro obtendo a altura do néctar; e subtraímos a altura do tubo pela altura do néctar, obtendo dessa forma, a distância do néctar para a abertura do tubo.

Disponibilidade de néctar na população e efeito no fitness reprodutivo

Nós estimamos a disponibilidade de néctar nas flores em termos relativos à capacidade de produção de néctar da população. Para tanto, nós criamos um índice de disponibilidade de néctar, que consiste na razão entre a quantidade de néctar encontrada na flor e a quantidade de néctar esperada de forma geral para as flores da população. Desta forma, esse índice engloba tanto a variação individual, como o consumo do néctar por polinizadores e seu efeito na secreção de néctar. Assim, quanto mais abaixo de um, menor é a disponibilidade de néctar em relação ao esperado na população e quanto maior que um, maior essa disponibilidade.

Nossa amostragem consistiu em coletas instantâneas de néctar em flores expostas aos polinizadores em campo, para as quais mensuramos volume. A coleta abarcou 223 flores tomadas ao acaso na população entre às 18:00 e 3:00 h. Concomitantemente, predizemos valores de volume para cada uma destas flores levando em conta o horário. Fizemos isto através de um modelo que criamos baseado em uma equação linear (volume em função do tempo) gerada a partir dos dados do tratamento de remoção pontual. Por fim, nós dividimos os valores de néctar obtidos pela quantidade de néctar predita.

Para testar o efeito desta disponibilidade de néctar no fitness reprodutivo de *H. neesinaus*, as flores descritas foram quantificadas quanto ao pólen depositado sobre os estigmas (fitness feminino) e o pólen remanescente (indicativo do fitness masculino). Para a contagem de pólen sobre os estigmas acondicionamos as flores em caixas de acrílico com ágar afim de manter a turgidez de seus pistilos e no laboratório analisamos o conteúdo polínico de seus estigmas. Essa análise se deu inicialmente por observação direta sob estereomicroscópio, e confirmada através de microscopia de fluorescência, com grãos de pólen corados com Azul de Anilina (Martin 1959). Simultaneamente, nós armazenamos as anteras destas flores em flaconetes tipo capsula junto com 1 ml de ácido láctico glicerinado 1:4 e as levamos para o

laboratório. A partir desta solução, com auxílio de uma câmara de Neubauer, estimamos a quantidade de pólen (adaptado de Maêda 1985).

Para verificar o efeito da disponibilidade de néctar sobre os componentes masculinos e femininos do fitness nós utilizamos modelos mistos lineares generalizados (Bates et al. 2014). Nós construímos dois modelos, cada um deles considerando um componente como variável dependente. Em ambos os modelos o tempo foi colocado como fator randômico, já o horário o índice de disponibilidade como fator fixo. A significância destes modelos foi obtida através da verossimilhança registrada na comparação com modelos nulos excluindo o índice de disponibilidade de néctar.

RESULTADOS

Dinâmica de néctar e efeito de remoção

Em relação ao padrão de secreção do néctar ao longo da antese (tempo: $er=0.7615$; $t=19.857$ / tratamento: $er=2.1537$; $t=-9.252$), houve um aumento de volume em função do tempo ($\chi^2=244.27$; $gl=1$; $p<0.00001$) (Figura 1-A). Concomitantemente, também houve efeito da remoção, com flores que passaram por remoções sucessivas produzindo menos néctar ($\chi^2=74.831$; $gl=1$; $p<0.00001$). No sentido oposto, a concentração de néctar (tempo: $ep=0.1224$; $t=-3.76$ / tratamento: $ep=0.3367$; $t=1.23$) diminuiu ao longo da antese ($\chi^2=13.87$; $gl=1$; $p<0.0001$) e não foi afetada pelo tipo de tratamento ($\chi^2=1.5022$; $gl=1$; $p=0.2203$) (Figura 1 – B). A quantidade de açúcares, dada a pouca variação da concentração, parece ter sido afetada principalmente pelo volume, seguindo padrões muito semelhantes (tempo: $ep=0.1908$; $t=19.784$; tratamento: $ep=0.5395$; $t=-8.831$), com aumento ao longo da antese ($\chi^2=68.96$; $gl=1$; $p<0.00001$) e sendo menor em flores que passaram por remoções sucessivas ($\chi^2=243.1$; $gl=1$; $p<0.00001$) (Figura 1 – C). Assim, a produção de néctar em *H. neesianus* é contínua ao longo da antese, respondendo positivamente ao tempo e sendo afetada negativamente pela remoção. Consequentemente, a atividade dos morcegos deve interferir diminuindo a quantidade de néctar produzido pelas flores.

Acesso ao néctar

O néctar de *H. neesianus* está contido dentro de um tubo floral curto e levemente curvado (Figura 2 - A). A porção inferior interna do tubo é completamente ocupada por um disco nectarífero que circunda o ovário no centro. A entrada deste tubo possui um alargamento que se projeta em direção aos lobos das pétalas do lábio inferior. A comunicação entre este

alargamento e o restante do tubo é parcialmente obstruída por dois filetes adnados à corola que se situam no terço superior do tubo (Figura 2 – B).

A conservação do fenótipo é consistente dentro de cada indivíduo e expressa por correlações entre suas flores: muito alta em relação ao volume de néctar ($r=0.95$; $gl=98$; $p<0.0001$), porém um pouco mais discreta em relação ao volume do tubo ($r=0.20$; $gl=98$; $p=0.046$). O volume total do néctar secretado por flor foi de $113.77\pm37.23\mu$, enquanto a capacidade volumétrica do tubo foi de $390.19\pm132.74\mu$. Desta forma, o néctar chega a ocupar $31.8\pm14.6\%$ do espaço do tubo, podendo essa estimativa ser ainda maior se considerarmos a presença de outras estruturas em seu interior (disco nectarífero e ovário). Isso resulta em uma pequena distância para o acesso ao néctar (Figura 2). Por outro lado, não há correlação entre o volume de néctar e a capacidade volumétrica do tubo ($r=0.09$; $gl=98$; $p=0.347$).

Disponibilidade de néctar na população e efeito no fitness reprodutivo

O volume de néctar encontrado nas flores expostas aos morcegos em campo variou bastante ao longo da antese (Figura 2 – C), com sucessivos aumentos e declínios decorrentes da sinergia entre a dinâmica de produção de néctar, variação individual, consumo dos morcegos e seu efeito na diminuição da secreção. O primeiro horário se inicia com valores mais baixos, seguido de picos de volume nos intervalos de 7:00-8:00h, 9:00-10:00h e 11:00-0:00h. Os declínios de volumes de néctar ocorreram nos intervalos de 8:00-9:00h e 10:00-11:00h, seguidos de um declínio contínuo à partir das 0:00h chegando próximo a zero próximo às 3:00h.

Ao considerar essa dinâmica em relação ao esperado para a população, expresso pelo índice de disponibilidade de néctar, encontramos um padrão um pouco diferente (Figura 2 – C). Com valores altos nas duas primeiras horas, seguidos de um declínio no intervalo entre 8:00-9:00h e um expressivo aumento entre 9:00-10:00h. A partir de então, a disponibilidade se mantém baixa, porém estável até às 0:00h, seguida de sucessivas quedas até não haver mais néctar disponível. A manutenção de uma alta disponibilidade nos primeiros horários ocorre, pois nesse período são naturalmente esperadas baixas quantidades de néctar. A partir das 10:00h os altos montantes esperados de néctar geram padrões muito parecidos tanto para o volume absoluto quanto para o índice de disponibilidade.

O componente do fitness feminino medido pela deposição de grãos de pólen limitou-se à uma variação de zero ao máximo de 15 grãos de pólen depositados sobre o estigma. Já o fitness masculino, interpretado como menores quantidades de pólen remanescente nas anteras variou bastante partindo de flores aparentemente intactas com mais de 143000 grãos de pólen até montantes entre 2500 e zero grãos de pólen (menor valor possível de ser capturado pela

câmara de Neubauer). Ambas as medidas de fitness, assim como seria obviamente esperado, aparentam um aumento progressivo ao longo do tempo de antese, o que não é de nosso interesse explorar e justifica sua inserção como variável aleatória no modelo.

Nós encontramos que há um efeito negativo da disponibilidade de néctar sobre o número de grãos de pólen depositados sobre o estigma ($\chi^2=27.447$; $gl=1$; $p<0.001$ / Figura 2 - D). No sentido oposto, há um efeito positivo da disponibilidade de néctar na quantidade de grãos de pólen remanescentes na antera ($\chi^2=19.285$; $gl=1$; $p<0.001$ / Figura 2 -E). Assim, o fitness de ambos os componentes, masculino e feminino, aumentam à medida que há menores disponibilidades de néctar nas flores.

DISCUSSÃO

Nossos resultados mostram que *Harpochilus neesianus* secreta néctar continuamente ao longo da antese aumentando o volume de néctar ao longo do tempo, enquanto diminui a concentração de açúcares. O volume e a quantidade de açúcar, são afetados pelo efeito de remoção de néctar. Embora o tubo floral seja curto, o acesso ao néctar é limitado pela inserção dos filetes na corola. Há pouca variação entre as flores de um mesmo indivíduo em relação ao volume total de néctar e a capacidade volumétrica do tubo. Assim, o néctar chega a ocupar até cerca de um terço do interior do tubo floral, embora essa relação não é tão conservada ao longo da população. A quantidade de néctar presente nas flores expostas aos polinizadores variou bastante ao longo da antese alternando-se entre sucessivos picos e declínios. Ao ser analisada na perspectiva da quantidade de néctar esperado para a população, através do índice de disponibilidade de néctar, os primeiros horários mantêm uma certa constância seguidos por um declínio progressivo à partir do meio da antese. Essa disponibilidade, gerada pela ação sinérgica do consumo, efeito de remoção e variações interespecíficas, repercute negativamente em relação aos fitness masculino e feminino.

Como o efeito de remoção negativo pode aumentar o fitness da população

Várias plantas desenvolvem estratégias para economizar néctar (Pyke 1991; Ornelas & Lara, 2009; Heil, 2011). No caso de *H. neesianus* essa estratégia é diminuir a produção diante do consumo. Flores que utilizam essa estratégia dispõem menores quantidades de energia para atrair visitantes florais e podem alocar energia para outras funções (Pyke 1991; Ornelas & Lara, 2009). Por outro lado, flores com efeito de remoção positivo também podem economizar energia ao secretar mais néctar apenas caso haja demanda imediata dos visitantes (Koptur

1983). Ambos os sistemas são regulados por mecanismos fisiológicos que utilizam gradientes de pressão osmótica para reconhecer e modular volume e concentração, havendo ainda a possibilidade de reabsorção do néctar ao final da antese (Cruden *et al.* 1983; Castellanos *et al.* 2002; Paccini & Nepi 2007; Nepi & Stpiczýnska 2008; Heil 2011). Essas estratégias podem ser determinantes para o sucesso de uma espécie, frente o alto gasto energético da produção de néctar. De fato, as plantas mobilizam reservas de amido e água, chegando a consumir a um terço da fotossíntese líquida diária (Southwick 1984). Especialmente no caso de flores quiropterófilas, os gastos podem chegar a ser absurdos, como em árvores que através do néctar secretam dezenas de quilos de açúcar em poucas semanas (Gribel *et al.* 1999; Capítulo 1 desta tese).

Em relação aos papéis na interação entre flores e polinizadores, ambos os tipos de efeitos de remoção podem ser importantes. Flores com efeito positivo podem manter a disponibilidade de recurso, sustentando visitas por mais tempo e aumentando as chances de polinização (Ordano & Ornelas 2004; Ornelas & Ordano 2007). Assim, o incremento na visita ocorre no nível de uma única flor ou nas flores de um único indivíduo, sendo lógico esperar que essa estratégia ocorra principalmente em plantas com baixas populações que demandam muitas visitas para atingir um sucesso reprodutivo adequado. De fato, a fim de suprir seu alto requerimento energético (Helfersen & Reyer, 1984), os morcegos realizam visitas recorrentes a flores com uma alta quantidade de néctar evitando realizar novas visitas a flores menos compensatórias (Winter & Stich 2005).

Certamente o caso acima não retrata a condição de *H. neesianus*, que limita sua produção de néctar, forma grandes populações e demanda pouca deposição de pólen para fecundar seus quatro únicos óvulos por flor. Neste caso, a produção limitada de néctar pode ser compensada por maiores quantidades de flores por indivíduo ou população (Gribel & Hay 1993; Bobrowiec & Oliveira 2012). Assim, um benefício do efeito de remoção negativo seria um incremento na frequência de polinizadores entre diferentes flores e indivíduos elevando o fitness da população como um todo (Pyke, 1991; Tschapka & Von Helversen 2007; Nepi & Stpiczýnska, 2008; Fisogni *et al.*, 2011).

Importância da restrição de acesso ao néctar

O acesso de entrada ao tubo floral de *H. neesianus* chama atenção por seu abrupto alargamento que facilita o acesso dos morcegos. Isso pode ser explicado pela forte pressão seletiva que morcegos exercem para o alargamento de tubos florais (Muchhala 2007; Lagomarsino *et al.* 2017; Joly *et al.* 2018). Adicionalmente, a distância de acesso ao néctar é

muito menor do que o comprimento registrado para línguas de morcegos nectarívoros (4-8 cm Muchhala e Thompson 2009). No sentido oposto, há uma forte restrição do acesso ao néctar pelos filetes. A partir destas evidências morfológicas e observações de visitas, sugerimos que o morcego deve apoiar o focinho sobre o alargamento do tubo e forçar a língua para romper o bloqueio dos filetes. Assim, apesar de ser necessário protrair pouco da língua, deve haver um certo esforço para acessar o néctar. Esse esforço pode ser intensificado nas flores com baixa disponibilidade de néctar, pois morcegos gastam mais tempo explorando flores quase vazias com suas línguas extensíveis (Tschapka & Von Helversen 2007).

Outros clados de Acanthaceae, alguns dos quais polinizados por morcegos, possuem uma estrutura semelhante, chamada cortina de filetes, que divide a corola em dois compartimentos com o acúmulo principal do néctar atrás de duas faixas de filetes (Rosales 1997; Manktelow 2000; Tripp & Manos, 2008). Um processo parecido pode ocorrer em outras famílias polinizadas por morcegos com flores abertas ou tubos curtos. Alguns exemplos são os filetes ou mesmo coronas bloqueando parcialmente entradas de tubos ou câmaras nectaríferas em plantas dos gêneros *Bauhinia* (Fabaceae), *Pilosocereus* (Cactaceae) e *Passiflora* (Passifloraceae) (Ramirez et al 1984; Rocha et al 2007; Prenner 2014). Este tipo de ajuste pode ter um papel importante ao assegurar que morcegos forcem seus corpos contra as flores intensificando a transferência de pólen (Muchhala e Thompson 2009).

Disponibilidade de néctar em resposta a visitação de morcegos e efeitos no fitness

O néctar pode ser secretado em ritmos regulares durante toda a vida das flores alcançando diferentes velocidades (Cruden *et al.* 1983; Heil, 2011). Embora *Harpochilus neesianus* secrete néctar continuamente ao longo da antese, a quantidade de néctar presente nas flores da população oscilou periodicamente. Nesse sentido, os picos de consumo podem ser explicados pelo comportamento de rotas de forrageamento dos morcegos. Dadas suas restrições fisiológicas e alta demanda energética, morcegos nectarívoros alimentam-se quase continuamente ao longo da noite, com numerosos vôos de forrageamento alternados com períodos de descanso (Tschapka & Von Helversen 2007; Aguiar *et al.* 2014; Welch & Suarez 2008; Helversen & Winter 2003). Por fim, a produção de néctar em *Harpochilus neesianus* cessa às 2:00h, coincidindo com o final do período de atividade dos morcegos nectarívoros em outras plantas. Sugere-se que tal atividade está associada a disponibilidade de flores com quantidade substancial de néctar de alta qualidade (Horner *et al.* 1998, SanMartinGajardo & Sazima 2005; Tschapka & Von Helversen 2007). Tais condições possibilitam uma forte associação entre a dinâmica de secreção e a atividade destes polinizadores, o que pode ter

repercussão sobre o fluxo de pólen (Koptur, 1983; Hodges, 1995; Klinkhamer *et al.* 2001; Musicante & Galetto 2008; Agostini *et al.* 2011).

As abordagens realizadas neste trabalho nos permitiram entender como se dão diferentes processos. Nós propomos como o efeito negativo de remoção pode aumentar o fitness da população, ilustramos a importância da restrição de acesso ao néctar e relacionamos a disponibilidade de néctar com a possível visitação por morcegos. Consequentemente, englobamos estes três efeitos em um índice que retrata simultaneamente a variação interespecífica e o consumo de néctar, bem como seu efeito na redução da secreção. Isso nos permitiu traçar um panorama geral de como se dá a disponibilidade de néctar ao longo da população e seu efeito no fitness. Assim, nós encontramos que flores que estejam abaixo do ótimo esperado para a população tem mais chances de terem sido polinizadas, alcançando maiores valores de fitness tanto masculino quanto feminino. Vários sistemas de polinização aumentam o fitness frente baixas disponibilidades de néctar (Pyke 1991; Tschapka & Helversen 2007; Nepi & Stpiczýńska 2008; Fisogni *et al.*, 2011). Esse padrão parece bem consistente desde que essa diminuição mesmo causada pelo consumo de pilhadores, ainda assim pode afetar a planta positivamente (Higashi *et al.* 1988; Navarro 2000; Richardson 2004).

Em geral, a quantidade de néctar e a produção de frutos são correlacionados significativamente em várias espécies (Zimmerman 1988, Cresswell & Galen 1991). Nossas evidências nos levam a crer que *Harpochilus neesianus* não necessita sustentar uma alta produção de néctar ao longo de toda a antese para obter valores ótimos de fitness, o que desafia o senso comum sobre a polinização por morcegos. Considerando a forma como polinizadores podem exercer pressões evolutivas sobre atributos do néctar (Mitchell *et al* 1998; BenitezVieyra 2010; Kulbaba & Worley 2012; Moré *et al* 2012), processos como o que retratamos aqui podem ter fortes impactos na forma como características do néctar de flores quiropterófilas estão sujeitas à seleção fenotípica.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao PELD-Catimbau (CNPq 459485 / 2014-8) e à FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco) que apoiaram esta pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agostini K, Sazima M, Galetto L (2011) Nectar production dynamics and sugar composition in two *Mucuna* species (Leguminosae, Faboideae) with different specialized pollinators. *Die Naturwissenschaften* 98: 933–942.

Aguiar L, Bernard E, Machado R B (2014) Habitat use and movements of *Glossophaga soricina* and *Lonchophylla dekeyseri* (Chiroptera: Phyllostomidae) in a *Neotropical savannah* *Zoologia* (Curitiba) 31(3), 223-229.

Amorim F W, Galetto L, Sazima M (2013) Behind the pollination syndrome: nectar ecology and the role of diurnal and nocturnal pollinators in the reproductive success of *Inga sessilis* (Fabaceae). *Plant Biology* 15: 317–327.

Bates D, Maechler M, Bolker B, Walker S (2014) *lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and S4*. R package version, 1(7), 1-23.

Benitez-Vieyra S, Ordano M et al. (2010) Selection on signal-reward correlation: limits and opportunities to the evolution of deceit in *Turnera ulmifolia* L. *Journal of Evolutionary Biology* 23: 2760-2767.

Brown J H, Calder III, W A, Kodric-Brown, A (1978) Correlates and consequences of body size in nectar-feeding birds. *American Zoologist* 18(4), 687-738.

Castellanos M C, Wilson P, Thomson J D (2002) Dynamic nectar replenishment in flowers of *Penstemon* (Scrophulariaceae). *Am. J. Bot.* 89: 111–118.

Cruden R W, Hermann S M, Peterson S (1983) Patterns of nectar production and plantpollinator coevolution. In: Bentley B, Elias T (Eds.). *The biology of nectaries*, pp. 80–125. Columbia University Press, New York.

Cruz-Neto O, Machado I C, Galetto L, Lopes A V (2015) The influence of nectar production and floral visitors on the female reproductive success of *Inga* (Fabaceae): a field experiment. *Botanical journal of the Linnean Society* 177(2), 230-245.

Fisogni A, Cristofolini G, Rossi M, Galloni M (2011) Pollinator directionality as a response to nectar gradient: promoting outcrossing while avoiding geitonogamy. *Plant Biology* 13: 848–856.

Gonzalez-Terrazas T P, Medellin R A et al.(2012) Morphological specialization influences nectar extraction efficiency of sympatric nectar-feeding bats. *Journal of Experimental Biology* jeb-068494.

Gowda V, Temeles E J, Kress W J (2012) Territorial fidelity to nectar sources by purplethroated caribs, *Eulampis jugularis*. *The Wilson Journal of Ornithology* 124(1), 81-86.

Gribel R, HAY J D (1993) Pollination ecology of *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae) in: *Central Brazil Cerrado vegetation*. *J. Trop. Ecol* 9: 199–211.

Harder L D (1986) Effects of nectar concentration and flower depth on flower handling efficiency of bumble bees. *Oecologia* 69(2), 309-315.

Haslett J R (1989) Adult feeding by holometabolous insects: pollen and nectar as complementary nutrient sources for *Rhingia campestris* (Diptera: Syrphidae). *Oecologia* 81(3), 361-363.

Heil M (2011) Nectar: generation, regulation and ecological functions. *Trends in Plant Science* 16: 191–200.

Higashi S, Ohara M, Arai H, Matsuo K (1988) Robber-like pollinators: overwintered queen bumblebees foraging on *Corydalis ambigua*. *Ecological Entomology*, 13, 411–418.

Hodges S A 1995. The influence of nectar production on hawkmoth behaviour, self pollination and seed production in *Mirabilis multiflora* (Nyctaginaceae). *American Journal of Botany* 82: 197–204.

Joly S, Lambert F et al. (2018). Greater pollination generalization is not associated with reduced constraints on corolla shape in Antillean plants. *Evolution*, 72(2), 244-260.

Klinkhamer P G L, De-Jong T, Linnebank L A (2001) Small-scale patterns determine ecological relationships: an experimental example using nectar production rates. *Ecology Letters* 4: 559–567.

Koptur S (1983) Flowering phenology and floral biology of *Inga* Fabaceae (Mimosoideae). *Systematic Botany* 8: 354–368.

Kulbaba M W, Worley A C (2012) Selection on floral design in *Polemonium brandegeei* (Polemoniaceae): female and male fitness under hawkmoth pollination. *Evolution* 66: 1344-1359.

Lagomarsino L P, Forrestel E J et al. (2017) Repeated evolution of vertebrate pollination syndromes in a recently diverged Andean plant clade. *Evolution*, 71(8), 1970-1985.

Maêda J M (1985) *Manual para uso da câmara de Neubauer para contagem de pólen em espécies florestais*. Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ.

Manktelow M (2000) The filament curtain: a structure important to systematics and pollination biology in the Acanthaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 133(2), 129-160.

Martin F W (1959) Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. *Stain technology* 34(3), 125-128.

Dias M R P (2017) Anatomia floral e nectários substitutivos em *Mimosa lewisii*, Leguminosae endêmica do Nordeste do Brasil polinizada por morcegos. *Dissertação de Mestrado* da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.

McKinney A M, CaraDonna P J et al. (2012) Asynchronous changes in phenology of migrating Broad-tailed Hummingbirds and their early-season nectar resources. *Ecology* 93(9), 1987-1993.

McPherson E G, Rowntree R A (1988) Geometric solids for simulation of tree crowns. *Landscape and Urban Planning* 15(1-2), 79-83.

Milet-Pinheiro P, Schlindwein C (2009) Pollination in *Jacaranda rugosa* (Bignoniaceae): euglossine pollinators, nectar robbers and low fruit set. *Plant Biology* 11(2), 131-141.

Mitchell R J, Shaw R G, Waser N M (1998) Pollinator selection, quantitative genetics, and predicted evolutionary response of floral traits in *Penstemon centranthifolius* (Scrophulariaceae). *International Journal of Plant Science* 159: 331-337.

More M, Amorim F W et al. (2012). Armament imbalances: match and mismatch in plant-pollinator traits of highly specialized long-spurred orchids. *PLoS One*, 7(7), e41878.

Muchhala N (2007) Adaptive trade-off in floral morphology mediates specialization for flowers pollinated by bats and hummingbirds. *The American Naturalist* 169(4), 494-504.

Muchhala N, Thomson J D (2009) Going to great lengths: selection for long corolla tubes in an extremely specialized bat–flower mutualism. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, rspb-2009.

Muchhala N, Thomson J D (2010) Fur versus feathers: pollen delivery by bats and hummingbirds and consequences for pollen production. *The American Naturalist* 175(6), 717-726.

Musicante M L, Galetto L (2008) Características del néctar de *Cologania broussonetti* (Balb.) DC. (Fabaceae) y su relación con los visitantes florales. *Ecología Austral* 18: 195–204.

Navarro L (2000) Pollination ecology of *Anthyllis vulneraria* subsp. *vulgaris* (Fabaceae): nectar robber as pollinators. *American Journal of Botany* 87, 980–985.

Nepi M, Stpiczýnska M (2008) Do plants dynamically regulate nectar features through sugar sensing? *Plant Signaling and Behavior* 3: 874–876.

Ordano M, Ornelas J F (2004) Generous-like flowers: nectar production in two epiphytic bromeliads and a meta-analysis of removal effects. *Oecologia* 140: 495–505.

Ornelas J F, Lara C (2009) Nectar replenishment and pollen receipt interact in their effects on seed production of *Penstemon roseus*. *Oecologia* 160: 675–685.

Paccini E, NEPI M (2007) Nectar production and presentation. In: Nicolson S W, Nepi M, Paccini E (Eds.). *Nectaries and nectar*, pp. 167–214. Springer, Dordrecht, The Netherlands

Petit S, FREEMAN C E (1997) The diet and reproductive schedules of *Leptonycteris curasoae curasoae* and *Glossophaga longirostris elongata* (Chiroptera: Glossophaginae) on Curaçao. *Biotropica* 29: 214–223.

Plowright C M S, Cohen-Salmon D, Landry F, Simonds V (1999) Foraging for nectar and pollen on thistle flowers (*Cirsium vulgare*) and artificial flowers: how bumble bees (*Bombus impatiens*) respond to colony requirements. *Behaviour* 136(8), 951-963.

Plowright R C (1987) Corolla depth and nectar concentration: an experimental study. *Canadian Journal of Botany* 65(5), 1011-1013.

Potts S G, Vulliamy B, et al. (2004) Nectar resource diversity organises flower-visitor community structure. *Entomologia experimentalis et applicata* 113(2), 103-107.

Prenner G (2014) Floral ontogeny in *Passiflora lobata* (Malpighiales, Passifloraceae) reveals a rare pattern in petal formation and provides new evidence for interpretation of the tendril and corona. *Plant systematics and evolution*, 300(6), 1285-1297.

Pyke G H (1984) Optimal foraging theory: a critical review. *Annual Review of Ecology and systematics* 15: 523–575.

Pyke G H 1991. What does it cost a plant to produce floral nectar? *Nature* 350: 58–59.

Quirino Z G M, Machado I C (2014) Pollination syndromes in a Caatinga plant community in northeastern Brazil: seasonal availability of floral resources in different plant growth habits. *Brazilian Journal of Biology*, 74(1), 62-71.

Ramirez N, Sobrevila C, de Enrech N X, Ruiz-Zapata T (1984) Floral biology and breeding system of *Bauhinia benthamiana* Taub. (Leguminosae), a bat-pollinated tree in Venezuelan “Llanos”. *American Journal of Botany*, 71(2), 273-280.

Richardson S C (2004a) Are nectar robbers mutualists or antagonists? *Oecologia*, 139, 246–254.

Roces F, Winter Y, von Helversen O (1993) Nectar concentration preference and water balance in a flower visiting bat, *Glossophaga soricina antillarum*. *Animal plant interactions in tropical environments*.

Rocha E A, Machado I C, Zappi D C (2007) Floral biology of *Pilosocereus tuberculatus*

(Werderm.) Byles & Rowley: a bat pollinated cactus endemic from the “Caatinga” in northeastern Brazil. *Bradleya*, 25, 129-144.

Rodríguez-Robles J A, Meléndez E J, Ackerman J D (1992) Effects of display size, flowering phenology, and nectar availability on effective visitation frequency in *Comparettia falcata* (Orchidaceae). *American Journal of Botany*, 79(9), 1009-1017.

Rosales, M. (1997) *Trichanthera gigantea* (Humboldt. Et Bonpland.) Nees, a review. In: *Livestock feed resources and integrated farming systems*. II FAO electronic conference on tropical feeds. Roma.

Sanmartin-Gajardo I, Sazima M (2005) Chiropterophily in *Sinningieae* (Gesneriaceae): *Sinningia brasiliensis* and *Paliavana prasinata* are bat pollinated, but *P. sericiflora* is not. Not yet? *Ann. Bot.* 95: 1097–1103

Southwick E E, (1984) Photosynthate allocation to floral nectar: a neglected energy investment. *Ecology* 65: 1775–1779.

Tripp E A, Manos P S (2008) Is floral specialization an evolutionary dead-end? Pollination system transitions in *Ruellia* (Acanthaceae). *Evolution: International Journal of Organic Evolution*, 62(7), 1712-1737.

Tschapka M, Von Helversen O (2007) Phenology, nectar production and visitation behaviour of bats on the flowers of the bromeliad *Werauhia gladioliflora* in a Costa Rican lowland rain forest. *Journal of Tropical Ecology*, 23(4), 385-395.

Von Helversen O, Reyer H U (1984) Nectar intake and energy expenditure in a flower visiting bat. *Oecologia* 63:178– 184.

Von Helversen O, Winter Y (2003) Glossophagine bats and their flowers: costs and benefits for plants and pollinators. pp. 346–398 In: Kunz T H, Fenton M B (eds.). *Ecology of bats*. The University of Chicago Press, Chicago

Von Helversen O (1995) Blumenfledermause und Fledermausblumen– Wechselbeziehungen zwischen Blute und Bestauber und energetische Grenzbedingungen. Rundgesprache der Kommission fur Okologie, Band Tropenforschung 10:217–229

Wanderley A M, Lopes A V, Machado I C (2014) Reproductive ecology of *Ameroglossum pernambucense* (Scrophulariaceae): is this ornithophilous and threatened shrub highly adapted to a naturally fragmented habitat? *Plant systematics and evolution*, 300(5), 1099-1110.

Welch K C, Suarez R K (2008) Dietary sugar as a direct fuel for flight in the nectarivorous bat *Glossophaga soricina*. *Journal of Experimental Biology* 211(3), 310-316.

Willmer P (2011) *Pollination and floral ecology*. Princeton University Press.

Winter Y, Stich K P. (2005) Foraging in a complex naturalistic environment: capacity of spatial working memory in flower bats. *J. Exp. Biol* 208: 539–548.

FIGURAS

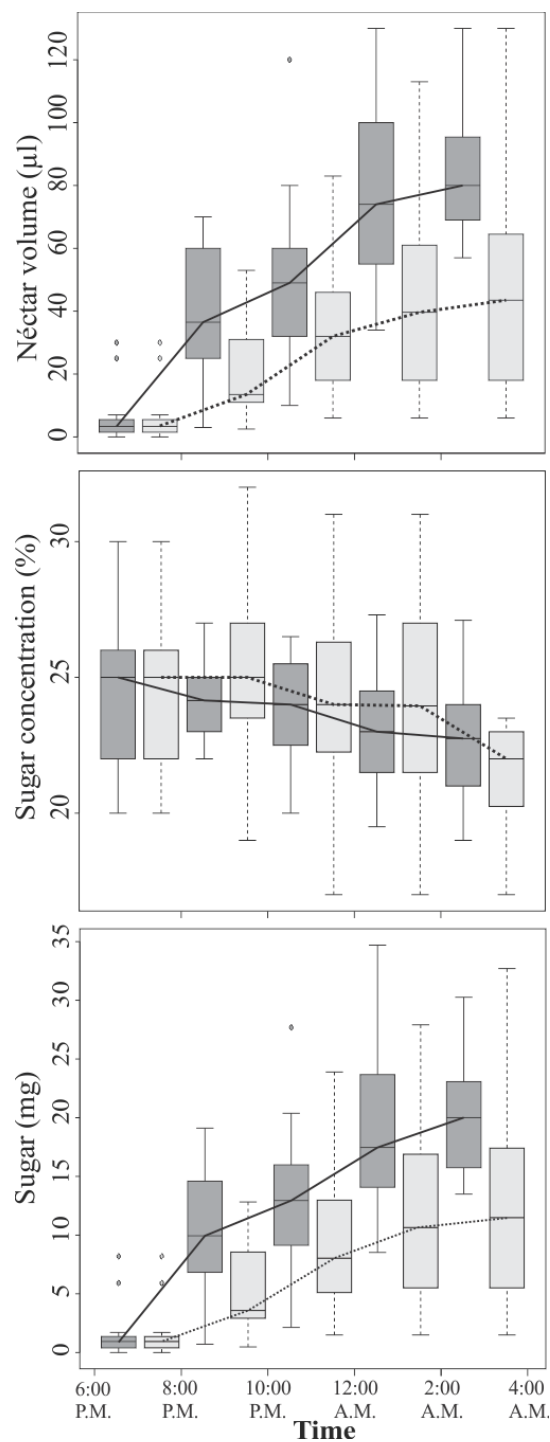


Figura 1 - Dinâmica de secreção e efeito de remoção do néctar para volume (A), concentração (B) e quantidade de açúcares (C) de *Harpochilus neesianus* (Acanthaceae) no PARNA Catimbau – Brazil (barras cinzas com linhas contínuas– remoção pontual a cada horário; barras brancas com linhas tracejadas – remoção contínua ao longo dos diferentes horários).

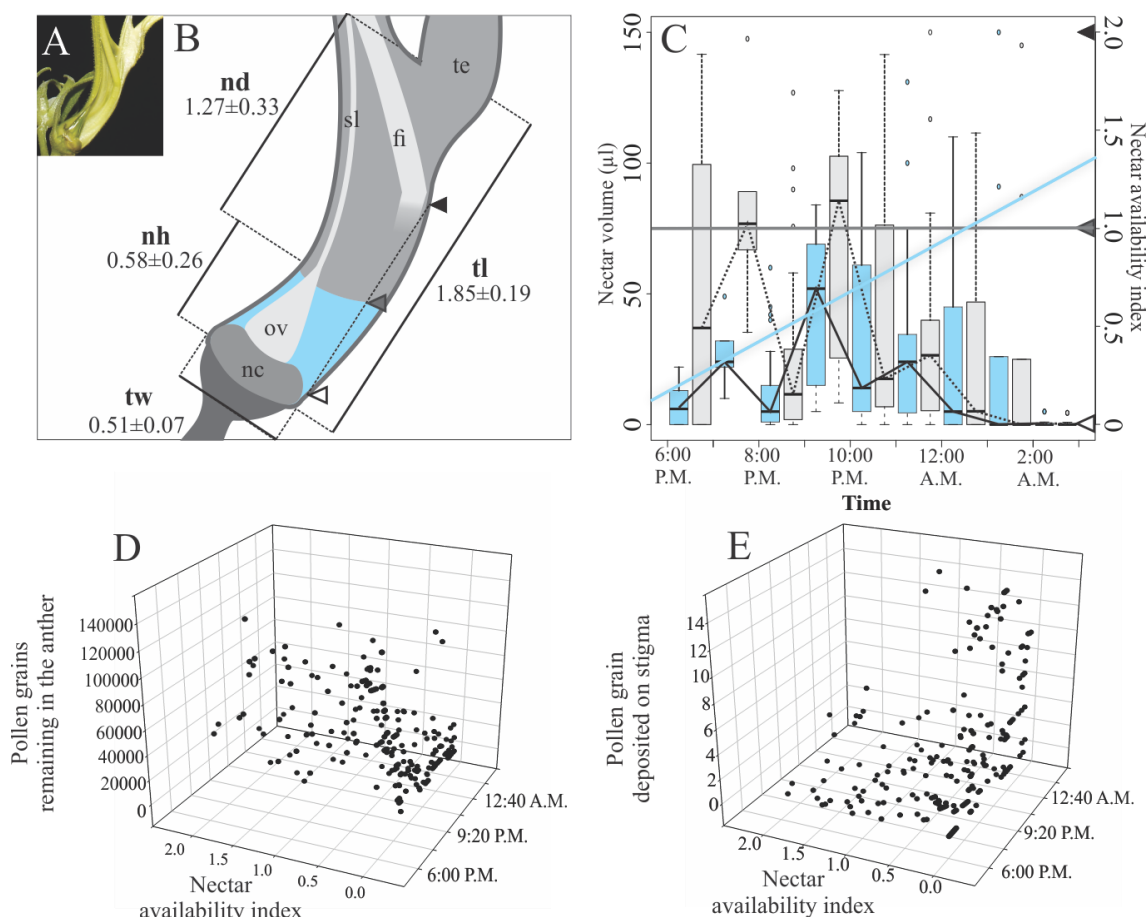


Figura 2 – Foto (A) e desenho esquemático (B) do interior do tubo floral de *Harpochilus neessianus* (Acanthaceae), indicando espaço ocupado pelo néctar e distância de acesso. Gráfico da disponibilidade de néctar encontrada na população ao longo da antese em termos absolutos e em relação à quantidade de néctar esperado dada a dinâmica de produção (C). Efeito da disponibilidade no néctar em cada flor sobre o fitness masculino (D) e feminino (E) ao longo da antese. (nd = distância do néctar; nh – altura do néctar no tubo; tl – comprimento do tubo; tw – largura do tubo; barras azuis – valores absolutos de néctar; barras cinzas – índice de disponibilidade de néctar; reta azul – disponibilidade de néctar esperada descrita por $y = 0.1588x + 9.8081$, $R^2 = 0.5848$, calculada a partir da dinâmica de néctar)

4 MANUSCRITO n°2: SWEET RAIN”: HYDRAULIC RESTRICTIONS IN BAT POLLINATED FLOWERS

(A ser enviado para a revista Biotropica)

Arthur Domingos-Melo^{1,4}, Ugo Mendes Diniz², Sofia Lucas Chalegre¹, Isabel Cristina Machado³

¹Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 50372-970, Brasil.

²Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 50670-901, Brasil.

³Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 50670-901, Brasil.

⁴E-mail: arthurdom.melo@gmail.com

ABSTRACT

The trade-off between open flower morphologies and the production of large nectar quantities in bat-pollinated flowers may result in nectar shedding. Our experiments and field samplings show how the sugar concentration modulates the nectar volume held by different flower morphologies in bat-pollination, however flowers avoid nectar wastage by producing volumes smaller than their max capacities, while seemingly restricting sugar concentrations according to bat requirements. These results show how the pressures exerted by pollinators challenge floral limitations.

KEYWORDS

Chiropterophily; flower morphology; nectar concentration; nectar volume; Brazilian Northeast

MAIN TEXT

Nectar is the most common floral resource in Angiosperms and its features suit the necessities of both plants and pollinators (Schmidt-Lebuhn et al. 2007; Johnson and Nicolson

2008). From the pollinator's side, the maintenance of water balance (Roces et al. 1993), fulfillment of energetic requirements (Welch and Suarez, 2008) and provision of secondary metabolites (Baracchi et al. 2017), while matching with the pollinator's mouthparts (Tschapka et al. 2015), are among the most important. From the plant's side, some of their main demands consist of resource saving (Pyke 1991), morphological adjustments (More et al. 2012) and pollinator fidelity (Baracchi et al. 2017). Nevertheless, some natural processes are capable of defying this coupling, which is the case of the "sweet rain".

The term "sweet rain" was coined by Gribel et al. (1999) while referring to the shedding of nectar from *Ceiba pentandra* (Malvaceae) flowers. In this bat-pollinated species, the dishshaped flowers normally shed part of the copious nectar they produce. Large nectar volumes are common among bat-pollinated flowers in response to energy needs of these animals, but many of those exhibit open flower types (Roces et al. 1993; Welch and Suarez, 2008; Fleming et al. 2009). In a scenario like that, any nectar volume produced that is not quickly consumed might be difficult to retain on the flower (Machado et al. 2005). Thus, balancing morphological restrictions with the necessity of producing copious amounts of nectar seems to be a key factor while transitioning to chiropterophily.

Nectar drops can be examined as a Newtonian fluid with hydraulic properties (i.e. adhesion, density and viscosity), which provide us with information about the forces that interact with gravity in its shedding process (Halliday et al. 2008). Adhesion is the attraction of a fluid to a surface (i.e. floral structures), while density represents the amount of matter per fluid volume, and viscosity, the resistance to runoff due to friction and the force of attraction between its composing molecules (Halliday et al. 2008). The latter two variables increase in function of sugar concentration (Soesanto and Williams 1981), although their effects on nectar shedding can be opposing. A high-density nectar is heavier and more prone to runoff, while a higher viscosity could prevent it.

We assessed the "sweet rain" phenomenon in the Caatinga dry forest in northeastern Brazil, which possesses one of the highest occurrence rates of bat-pollinated flowers in the world (Machado and Lopes 2004). We evaluated how flower morphology and sugar concentration affect nectar retention on the flower and how these effects are associated with the secretion of nectar drops under natural conditions. We present the hypothesis that species a larger available contact area supports nectar drops with larger volumes and that there are optimal intermediate sugar concentration values in which nectar accumulation is favored.

METHODS

To answer our questions, we registered the event of “sweet rain” in three bat-pollinated species in the Caatinga: *Calliandra aeschynomoides* (Fabaceae - Mimosoideae), *Tarenaya spinosa* (Cleomaceae) e *Hymenaea cangaceira* (Fabaceae - Detarioideae). All these species offer their nectar as a completely exposed drop, but each presents a particular morphology and, thus, different holding capacities.

Calliandra aeschynomoides has glomerule-type inflorescences, which form a brushlike pseudoflower with 10 to 12 flowers, which are long and delicate and bear small-surface stamen tubes capable of holding one nectar drop each. *Tarenaya spinosa* has banner-type flowers. The nectarium, which is placed on the floral receptaculum and between the petals and reproductive whorls, has an intermediate surface that supports one nectar drop. Finally, the flowers of *H. cangaceira* are cup-shaped. As a result of having large flowers and concave petals, the nectar accumulates as a drop on the lower petals.

We assessed how the nectar accumulation capacity differs between these species and how it is affected by sugar concentration. We conducted controlled experiments of nectar accumulation, thus isolating other factors (e.g. flower position on plant and wind) that could intensify the “sweet rain” (Gribel et al. 1999). We sampled the flowers used in the bioassay from the Catimbau National Park (Pernambuco, Brazil). Additional samplings of *T. spinosa* were conducted within Recife (Pernambuco, Brazil). We collected opened standard flowers from previously bagged buds and fixed them onto a plasticine pedestal, taking into account the average natural orientation observed in the populations (ca. 45° inclination of the pedicel in relation to the gravity axis, for all three species).

We manufactured different solutions containing distilled water and concentrations of sucrose ranging from 5% to 50% to mimic natural nectar. The experiment consisted in depositing the artificial nectar on the regular accumulation spots of each species until the occurrence of shedding. We applied the solutions with 50 µL graduated microsyringes (Hamilton™) and registered the total accumulated volume until shedding. We repeated this assay 15 times for each concentration in all three species.

Using this data, we compared the total nectar accumulation capacity between the species and employed quadratic regressions to test the relationship between volume and concentration. We expected intermediate values of concentration to result in larger volumes of accumulated nectar.

Additionally, we assessed if nectar drops secreted by the three species under natural conditions show the same patterns found with the nectar accumulation experiments. We bagged buds in pre-anthesis from natural populations to block the access of flower visitors. Then, from two to six hours after flower opening, we collected the nectar drops accumulated on flowers and measured their volumes and concentrations through standard procedures (Galleto and Bernardello 2005) (*C. aeschynomenoides* $n=64$ flowers/10 inflorescences/10 plants; *T. spinosa* $n=30$ flowers/30 plants; *H. cangaceira* $n=90$ flowers/10 plants).

We compared nectar volume and concentration between species and, for each species, the volumes secreted naturally with the total volumes supported in the accumulation experiments. Finally, we tested whether there was any correlation between volume and concentration in the nectar drops for each species.

RESULTS

The total nectar volumes supported by standard flowers differed substantially, with larger-flowered species supporting larger volumes ($H=399.18$; $gl=2$; $p<0.00001$; all *a posteriori* tests with $p<0.0001$). *Calliandra aeschynomenoides* flowers carried 10.17 ± 2.62 μL , followed by *T. spinosa* with 83.13 ± 8.35 μL and *H. cangaceira* with 878.29 ± 75.58 μL .

The models proposed by the quadratic regressions were able to explain, for all three species, the effect of nectar concentration on their maximum holding capacities (*C. aeschynomenoides*: $F=15.24$; $gl=2$; $r^2=0.16$; $p<0.0001$ / *T. spinosa*: $F=16.25$; $gl=2$; $r^2=0.17$; $p<0.0001$ / *H. cangaceira*: $F=81.51$; $gl=2$; $r^2=0.52$; $p<0.0001$). Each species, however, showed a particular pattern of direction and intensity of the effect. *Calliandra aeschynomenoides* achieves larger nectar volumes with medium to high concentration values (x coefficient: $t=5.52$; $p<0.0001$ / x^2 coefficient: $t=-5.38$; $p<0.0001$). In *T. spinosa*, concentration showed a slightly positive effect on volume (x coefficient: $t=2.81$; $p<0.0058$ / x^2 coefficient: $t=-1.62$; $p<0.1069$). *H. cangaceira* flowers attained the largest nectar volumes mostly with low sugar concentrations, but also with high concentrations (x coefficient: $t=-10.09$; $p<0.0001$ / x^2 coefficient: $t=8.07$; $p<0.0001$).

The volume of natural nectar drops produced by flowers also differed strongly between species ($H=162.95$; $gl=2$; $p<0.00001$; all *a posteriori* tests with $p<0.0001$), but was overall lower than those attained in the bioassays (*C. aeschynomenoides*: $U=11.13$; $p<0.0001$ / *T. spinosa*: $U=8.63$; $p<0.0001$ / *H. cangaceira*: $U=14.90$; $p<0.0001$). *Calliandra aeschynomenoides* secreted 1.70 ± 0.61 μL , followed by *T. spinosa* with 32.63 ± 11.47 μL and *H.*

cangaceira with 196.63 ± 156.44 μL . Sugar concentrations also differed: $23.56 \pm 5.30\%$, 16.20 ± 3.67 and 17.40 ± 2.84 μL , respectively ($H = 81.65$; $gl = 2$; $p < 0.0001$; all *a posteriori* test with $p < 0.05$)

We found a slight correlation between volume and concentration in *C. aeschynomoides*, although the effect seems to be irrelevant ($t = -2.56$; $gl = 61$; $r^2 = 0.097$; $p = 0.0127$). There was no correlation for the other two species (*T. spinosa*: $t = -1.35$; $gl = 28$; $r^2 = 0.06$; $p = 0.1861$ / *H. cangaceira*: $t = 0.19$; $gl = 145$; $r^2 = 0.0003$; $p = 0.84$).

DISCUSSION

The role of floral morphology on the physical properties of nectar has been, so far, related mostly to strategies to avoid evaporation and dilution by rainfall (Corbet and Willmer 1981; Aizen 2003). Here, we propose that different flower morphologies are able to change the effect of sugar concentration on the capacity of nectar accumulation. For flowers that produce suspended nectar droplets, viscosity and weight appear to nullify one-another in a concentration range in which nectar accumulates the most. Viscosity seems to prevail in flowers with intermediate nectar quantities, as larger volumes were associated with higher concentrations. Drop weight is seemingly the most important limiting factor for large flowers, which in turn produce copious nectar quantities.

Thus, nectar shedding may not be related to a lack of flower volumetric capacity since the volume that they naturally secrete is roughly three to ten times smaller than their maximum holding capacity. Tube flowers are a good example of this discrepancy, although their case has been regarded as a strategy to hinder pollinators in accessing the nectar (Moré et al. 2012).

As our model flowers do not form tubes, we suggest that the disparity observed might be associated with the reduction of energy cost (Ornduff 1969), and may consist in a security strategy to avoid nectar wastage by the flower (Pyke 1991). Furthermore, smaller nectar quantities can force bats to increase their visiting rates (Tschapka and Von Helversen), allowing an adjustment of the visit timing to the secretion of new nectar drops (Machado et al. 2005).

Nectar concentration in natural conditions did not achieve the requirements determined experimentally by the flowers either. In this context, pollinators seem to be the main determining forces (Mitchell and Waser 1992; Johnson and Nicolson 2008). Bats are constrained on a fine scale by the concentration of the nectar they consume. While a too diluted nectar may not supply their energy requirements, high sugar concentrations affect the biomechanics of their tongues and their water balance (Roces et al. 1993; Welch and Suarez,

2008; Tschapka et al. 2015). Although different from one another, the three species had, indeed, sugar concentrations between 10% and 30%, which is considered the optimal range for pollinating bats (Roces et al. 1993; Welch and Suarez, 2008).

Inevitably, pollinators have been considered as the main agents responsible for mediating the effect of phenotypical selection on nectar (Mitchell and Waser 1992). Our predictions were partially confirmed. Depending on flower morphology, concentration can show different effects on nectar volume, but, in nature, nectar qualities may not completely achieve the optimal hydraulic conditions. Flowers seem to reduce the risk of “sweet rain” by secreting nectar volumes smaller than their holding capacity, and this restriction could be beneficial if it leads to an eventual increase in bat visiting rates. Additionally, the requirements of bats seem to surpass the hydraulic restrictions of plants, maintaining sugar percentages in nectar close to the optimal values for these animals.

Our work reaffirms how pollinators can be a peremptory force in directing the evolution of nectar traits (Mitchell and Waser 1992), even in risky conditions for plants such as in the sweet rain event. However, this might be a fair trade when taking into account the famous high efficiency of bats as pollinators (Muchhala and Thomson 2010).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank PELD-Catumbau (CNPq 459485 / 2014-8) and FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco) for supporting this research. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

LITERATURE CITED

- AIZEN, M. A. 2003. Down-facing flowers, hummingbirds and rain. *Taxon* 52: 675-680.
- BARACCHI, D., MARPLES, A., JENKINS, A. J., LEITCH, A. R., AND CHITTKA, L. 2017. Nicotine in floral nectar pharmacologically influences bumblebee learning of floral features. *Sci. Rep.* 7: 1951.
- CORBET, S. A., AND WILLMER, P. G. 1981. The nectar of *Justicia* and *Columnea*: composition and concentration in a humid tropical climate. *Oecologia* 51: 412-418.
- FLEMING, T. H., GEISELMAN, C., AND KRESS, W. J. 2009. The evolution of bat pollination: a phylogenetic perspective. *Ann. Bot.* 104: 1017-1043.

GALETTI, L., AND BERNARDELLO, G. 2005. Rewards in flowers: nectar. In: Dafni A., KEVAN P.G., AND HUSBAND B.C. (Eds.), Practical pollination biology. Cambridge, Ontario: Enviroquest.

GIBBS, P. E., OLIVEIRA, P. E., AND BIANCHI, M. B. 1999. Postzygotic control of selfing in *Hymenaea stigonocarpa* (Leguminosae-Caesalpinioideae), a bat-pollinated tree of the Brazilian Cerrados. *Int. J. Plant. Sci.* 160: 72-78.

GRIBEL, R., GIBBS, P. E., AND QUEIROZ, A. L. 1999. Flowering phenology and pollination biology of *Ceiba pentandra* (Bombacaceae) in Central Amazonia. *J. Trop. Ecol.* 15: 247-263.

HALLIDAY, D., RESNICK, R., AND WALKER, J. 2008. Fundamentos de Física Volume 1: Mecânica, 8.ª Edição. LTC–Livros Técnicos e Científicos Editora Ltda., Rio de Janeiro, Brasil.

JOHNSON, S. D., AND NICOLSON, S. W. 2008. Evolutionary associations between nectar properties and specificity in bird pollination systems. *Biol. Lett.* 4: 49-52.

KRÖMER, T., KESSLER, M., LOHAUS, G., AND SCHMIDT-LEBUHN, A. N. 2008. Nectar sugar composition and concentration in relation to pollination syndromes in Bromeliaceae. *Plant Biology*, 10: 502-511.

MACHADO, I. C., AND LOPES, A. V. 2004. Floral traits and pollination systems in the Caatinga, a Brazilian tropical dry forest. *Ann. Bot.* 94: 365-376.

MACHADO, I. C., LOPES, A. V., LEITE, A. V., AND NEVES, C. B. 2006. *Cleome spinosa* (Capparaceae): Polygamodioecy and pollination by bats in urban and Caatinga areas, northeastern Brazil. *Bot. Jahrb. Syst. Pflanzengesch. Pflanzengeogr.* 127: 69-82.

MITCHELL, R. J., AND WASER, N. M. 1992. Adaptive significance of *Ipomopsis aggregata* nectar production: pollination success of single flowers. *Ecology* 73: 633-638.

MORE, M., AMORIM, F. W., BENITEZ-VIEYRA, S., MEDINA, A. M., SAZIMA, M., AND COCUCCI, A. A. 2012. Armament imbalances: match and mismatch in plant-pollinator traits of highly specialized long-spurred orchids. *PLoS One* 7: e41878.

MUCHHALA, N., AND THOMSON, J. D. 2010. Fur versus feathers: pollen delivery by bats and hummingbirds and consequences for pollen production. *Am. Nat.* 175: 717-726.

ORNDUFF, R. 1969. Reproductive biology in relation to systematics. *Taxon* 18:121-133.

PYKE, G. H. 1991. What does it cost a plant to produce floral nectar? *Nature* 350: 58-59.

- ROCES F, WINTER Y, HELVERSEN O v. 1993. Nectar concentration preference and water balance in *Glossophaga soricina antillarum*. In: BARTHLOTT W, NAUMANN CM, SCHMIDTLOSKE K, SCHUMANN KL, EDS. Animal-plant interactions in tropical environments. Bonne: Zoologisches Forschungsinstitut und Museum Alexander Koenig,
- SCHMIDT-LEBUHN, A. N., SCHWERDTFEGGER, M., KESSLER, M., AND LOHAUS, G. 2007. Phylogenetic constraints vs. ecology in the nectar composition of Acanthaceae. *Flora* 202: 62-69.
- SOESANTO, T., AND WILLIAMS, M. C. 1981. Volumetric interpretation of viscosity for concentrated and dilute sugar solutions. *J. Phys. Chem. Biophys.* 85: 3338-3341.
- TSCHAPKA, M., AND VON HELVERSEN, O. 2007. Phenology, nectar production and visitation behaviour of bats on the flowers of the bromeliad *Werauhia gladioliflora* in a Costa Rican lowland rain forest. *J. Trop. Ecol.* 23: 385-395.
- TSCHAPKA, M., GONZALEZ-TERRAZAS, T. P., AND KNÖRNSCHILD, M. 2015. Nectar uptake in bats using a pumping-tongue mechanism. *Sci. Adv.* 1: e1500525.
- WELCH, K. C., AND SUAREZ, R. K. 2008. Dietary sugar as a direct fuel for flight in the nectarivorous bat *Glossophaga soricina*. *J. Exp. Biol.* 211: 310-316.

FIGURES

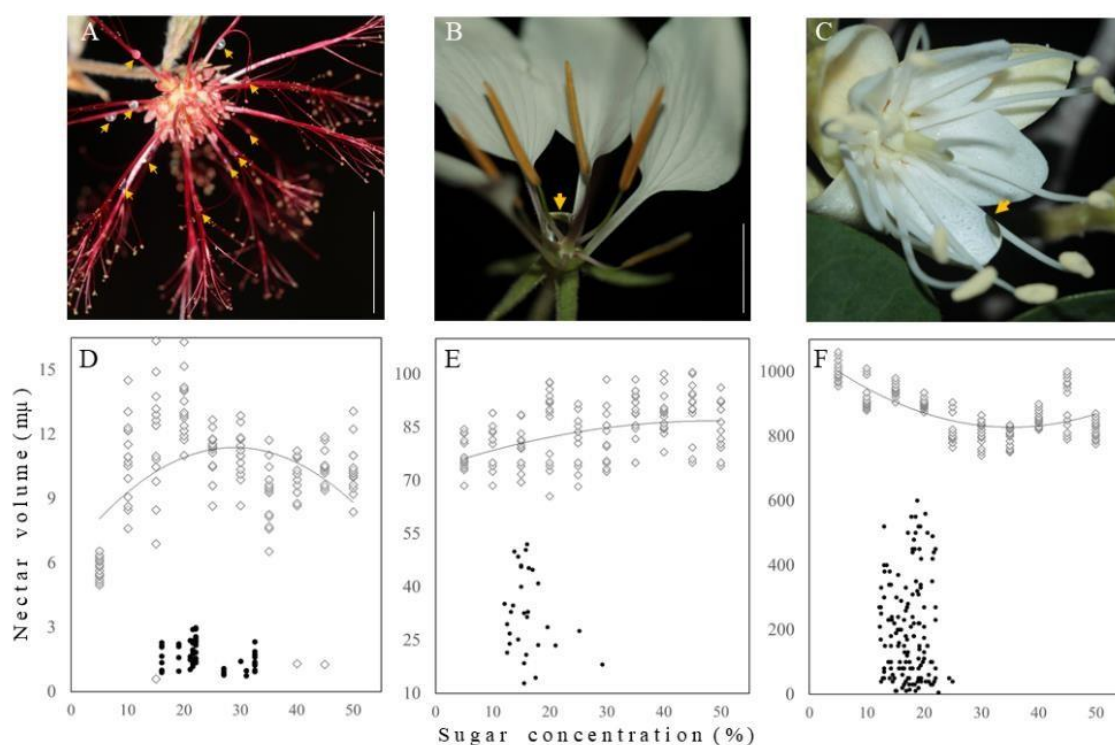


Figure 1 – “Sweet rain” in bat-pollinated plants in the Caatinga dry forest, showing the effect of nectar concentration on total volume supported under experimental conditions (A – C) and samplings of nectar secreted under natural conditions (D – F) in the Catimbau National Park, Pernambuco, Brazil. A and D - *Calliandra aeschynomoides* (Fabaceae - Mimosoideae); B and E - *Tarenaya spinosa* (Cleomaceae); C and F - *Hymenaea cangaceira* (Fabaceae - Detarioideae). (White vertical bars – 1 cm scale; yellow arrows – nectar drops; white lozenges - drops of artificial nectar accumulated on standard flowers; grey line – quadratic regression of nectar volume in function of its concentration; black circles - Drops of nectar accumulated under natural conditions.).

5 MANUSCRITO n°3: IT'S RAINING FRAGRANT NECTAR IN THE CAATINGA DRY FOREST: AN EVIDENCE OF NECTAR OLFACTORY SIGNALING IN BAT FLOWERS

(A ser enviado para a revista Ecology)

Arthur Domingos-Melo^{1,4}, Paulo Milet-Pinheiro¹, Daniela Maria Do Amaral Ferraz Navarro², Ariadna Valentina Lopes^{3,4}, And Isabel Cristina Machado³

MAIN TEXT

Pollination by bats is one of the most spectacular pollination strategies of Angiosperms. Among their attributes, the physiology of flowers is particularly striking, because bat flowers secrete huge amounts of nectar and normally emit peculiar odors (Fleming 2009). In flowers, it is known that different tissues can produce their own scents (Raguso 2004) and that pollinators may use these spatial-within flower scent variation as honest signaling of resource (e.g. nectar, pollen) availability (Dötterl et al. 2005). For bat flowers of *Vriesea*, there is only a suggestion that the nectar produces its own scent (e.g. *Vriesea* - Sazima et al. 1995). In *Agave* there is an inconclusive evidence associated with the action of microorganisms (Raguso 2004), suggesting scented nectar might be involved in honest plant-pollinator signaling. In this context, we can highlight the genus *Hymenaea* (Fabaceae). This genus is pollinated predominantly by bats and produce large amounts of nectar (Gibbs et al. 1999; Dunphy et al. 2004). However, it remains largely unknown whether their flowers emit scents and, if yes, whether they are involved in signaling to pollinators.

Hymenaea cangaceira (Fabaceae) (Pinto et al. 2017) is a recently described species, endemic to the Caatinga, a Brazilian Tropical Dry Forest. It was named after the "Cangaceiros", local social bandits (*sensu* Hobsbawm 2000), whose secret route overlaps with the distribution

¹ Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 50372-970, Brazil.

² Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 50670-901, Brazil.

³ Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 50670-901, Brazil.

⁴ 4E-mail: arthurdom.melo@gmail.com

of the species (Pinto et al. 2017). *Hymenaea cangaceira* has first called our attention because of its massive flowering and its abundant and fragrant nectar. Facing this unusual phenomenon, we studied a population of this species in the Catimbau National Park - PE, Brazil (8 ° 34'51 "S, 37 ° 14'56 "W) that flowered continuously from December to March between 2015 and 2018 (two to four weeks per individual in sequential flowering). During these reproductive seasons, we identified bats (Figure 1 A-B) as the only effective pollinators, since they were the only floral visitors that touched the mature reproductive structures. In order to understand better the role of nectar in this system, we characterized precisely its properties. For this, we first measured the volume and concentration of individual flowers and estimated the total nectar produced from the total number of flowers set by each plant in one reproductive season (Appendix S1). Then, we collected samples of volatile compounds emitted by flowers from which nectar had been experimentally removed and from nectar removed from flowers by using usual headspace techniques and identified compounds after analyzing samples by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GCMS) (Appendix S1).

A single flower of *H. cangaceira* produces 0.26-1.5 ml of nectar with sugar concentration ranging from 15 to 25% (0.16-0.27 mg). These trees have medium to large crowns with 4.0-9.5 m in height and 3.5-13.5 m in diameter, generating large canopy areas (236.7-1,406.3 m²). The flowers are distributed homogeneously at the canopy surface, which have 80-288 flowers per m² (Figure 1-B). Based on our estimative that a single tree produces 47,812-623,636 of flowers per reproductive season, a single individual might produce the astonishing amount of 39.37 to 918.7 liters of nectar and 7.42-180.54 kg of sugar. This nectar accumulates as drops at the base of the corolla and lower petals and easily falls on the ground (Figure 1-C), in a process known as "sweet rain" (Gribbel, 1999). The magnitude of this reproductive investment in *H. cangaceira* is impressive, especially when considering that this species occurs in the semiarid Caatinga region, where plants are frequently under strong resource limitation (Silva 2018). The only other species in which this phenomenon of sweet rain has been reported is *Ceiba pentandra* (Malvaceae-Bombacoide), a species occurring in Central Amazonia, an environment with high productivity (Gribbel 1999).

As we had already supposed out in our field observations, the chemical analyzes revealed that the nectar of *H. cangaceira* has its own scent, since it has many compounds that are not found in flowers. In total, we found 80 volatile compounds in all analyzed headspace samples, of which 42 were reported in flowers only, 20 in flowers and nectar and 18 in nectar only (Table S1). The dominant compounds in nectar samples were (*E*)-cinnamaldehyde and

γ -decalactone, which accounted for 53.6 % and 14.1 % of the total scent discharge, respectively. These compounds were reported in trace amounts in samples of flowers from which nectar had been removed, suggesting they are remnants of the fragrant nectar. To our best knowledge, this is the first report of nectar olfactory signaling in bat-pollinated plants. There is so far only one report of fragrant nectar in *Agave palmeri* (Agavaceae), which was interpreted as a result of the fermentation process of the associated microbiota, rather than a characteristic of the nectar itself (Raguso 2004). The association with microbes is very unlike in *H. cangaceira*, because we collected volatile compounds from bagged flowers only, at the very beginning of the nectar secretion phase.

The biological role that the major volatiles of *H. cangaceira* nectar play in bats has never been investigated; however, their characteristics strongly suggest they mediate plant-bat communication. Cinnamaldehyde is the compound that gives cinnamon its characteristic smell, whereas γ -decalactone has an aroma typical to fermented fruits. Both are used in the food industry composing ripe fruit essences (World of Chemicals, 2018), which is consistent with the expected odors for bat pollination (Fleming 2009). In addition, there is evidence that mammals, including humans, are highly sensitive to these compounds: Cinnamaldehyde is a remarkable scent and γ -decalactone occurs in different body secretions with strong aromatic appeal in this class of vertebrates, being reported, for example, in human vaginal lubrication (Soine et al. 2009; Hartmann et al. 2013).

The fragrant nectar emitted from flowers across the entire canopy surface might allow the tree to be perceived as a single giant odor plume (Murlis et al. 1992). This would be analogous to the visual effect that occurs in species whose expressive number of flowers determines the color of the entire canopy. In these plants, many flowers are not visited by animals and only contribute to the canopy long-distance visual display (Brito et al. 2015). Likewise, in *H. cangaceira*, much of the produced nectar is not consumed (as illustrated by the "sweet raining") and might only contribute to the canopy long-distance olfactory attraction. If this result in increased attractiveness to pollinators then the apparently waste of nectar (i.e. energy) could be counterbalanced by an increased fitness and would actually represent an adaptive strategy. Therefore, the presence of odor in the nectar would justify the occurrence of the aforementioned "sweet rain". Additionally, bats are known to rely on scents as shortdistance cue (Gonzalez-Terrazas et al. 2017), and could avoid flowers whose nectar has been consumed or spilled. Therefore, in *H. cangaceira*, it seems that the fragrant nectar also honestly signals reward availability to their pollinators (see, for example, Zang et al. 2012).

The record of fragrant nectar in *H. cangaceira* opens new perspectives for understanding the chemical communication between flowers and their pollinating bats. We believe that this process may be recurrent in chiropterophilous plants, since other species present very similar flower features, especially in the genus *Hymenaea* (Gribbel, 1999; Gibbs et al. 1999; Dunphy et al. 2004; Fleming et al. 2009). In this way, plenty of intriguing questions emerge, such as: How does volatile emission in nectar fluctuate along the anthesis? Is there a coupling between volatiles and nectar characteristics (volume and concentration of sugars)? What is its effect on plant fitness? To answer these questions may reveal exciting patterns with strong ecological and evolutionary significance, after all, bat pollination is the most recent evolved pollination system (Fleming 2009) and we do not know many unusual features that may have arisen along its evolutionary history.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank to PELD-Catimbau (Programa de Pesquisa Ecológica de Longa Duração), CNPq 459485/2014-8 (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco) that supported this research.

LITERATURE CITED – MAIN TEXT

Brito, V. L., Weynans, K., Sazima, M. and Lunau, K. 2015. Trees as huge flowers and flowers as oversized floral guides: the role of floral color change and retention of old flowers in *Tibouchina pulchra*. *Frontiers in Plant Science*, 6: 362. da Silva, J. M. C., Leal, I. R., and Tabarelli, M. (Eds.). 2018. Caatinga: the largest tropical dry forest region in South America. Springer.

Dötterl, S. and Jürgens, A. 2005. Spatial fragrance patterns in flowers of *Silene latifolia*: Lilac compounds as olfactory nectar guides? *Plant Systematics and Evolution*, 255: 99-109.

Dunphy, B. K., Hamrick, J. L. and Schwagerl, J. 2004. A comparison of direct and indirect measures of gene flow in the bat-pollinated tree *Hymenaea courbaril* in the dry forest life zone of southwestern Puerto Rico. *International Journal of Plant Sciences*, 165: 427-436.

Fleming, T.H., Geiselman, C. and Kress, W.J. 2009. The evolution of bat pollination: a phylogenetic perspective. *Annals of Botany* 104: 1017-1043.

Gonzalez-Terrazas, T. P., Martel, C., Milet-Pinheiro, P., Ayasse, M., Kalko, E. K. and Tschapka, M. 2016. Finding flowers in the dark: nectar-feeding bats integrate olfaction and echolocation while foraging for nectar. *Royal Society Open Science*, 3: 160-199.

Gribel, R., Gibbs, P. E. and Queiroz, A. L. 1999. Flowering phenology and pollination biology of *Ceiba pentandra* (Bombacaceae) in Central Amazonia. *Journal of Tropical Ecology*, 15: 247-263.

Hartmann, C., Triller, A., Spehr, M., Dittrich, R., Hatt, H., and Buettner, A. 2013. Sperm-Activating odorous substances in human follicular fluid and vaginal secretion: Identification by Gas Chromatography–Olfactometry and Ca²⁺ Imaging. *ChemPlusChem*, 78: 695-702.

Hobsbawm, E. 2003. *Bandits 1969*. London: Abacus (Time Warner Books). Hobsbawm, E. (2000). *Bandits. 1969. New York: New P.*

Murlis, J., Elkinton, J. S. and Carde, R. T. 1992. Odor plumes and how insects use them. *Annual Review of Entomology*, 37: 505-532.

Pinto, R. B., de Freitas Mansano, V., Torke, B. M. and de Azevedo Tozzi, A. M. G. 2017. On the “Cangaço” route: a new species of *Hymenaea* (Leguminosae) from the Brazilian Caatinga. *Kew Bulletin*, 72: 42.

Raguso, R. A. 2004. Why are some floral nectars scented? *Ecology*, 85: 1486-1494.

Sazima, M., Buzato, S. & Sazima, I. 1995. Bat pollination of *Vriesea* in southeastern Brazil. *Bromelia*, 2: 29-37.

Soini, H. A., Wiesler, D., Koyama, S., Féron, C., Baudoin, C. and Novotny, M. V. 2009. Comparison of urinary scents of two related mouse species, *Mus spicilegus* and *Mus domesticus*. *Journal of Chemical Ecology*, 35: 580-589.

World of Chemicals, 2018, <http://www.worldofchemicals.com/chemicals/chemicalproperties>.

Zhang, F. P., Larson-Rabin, Z., Li, D. Z. and Wang, H. 2012. Colored nectar as an honest signal in plant-animal interactions. *Plant Signaling & Behavior*, 7: 811-812.

FIGURES – MAIN TEXT



FIG. 1. Attraction of bats by *Hymenaea cangaceira* (Leguminosae-Fabaceae): Phyllostomidae bat approaching a tree in massive flowering (top) and a flower (center). Flower of *H. cangaceira* with a falling drop of nectar and the molecular structures of the main volatile compounds of the nectar (bottom).

ECOLOGY: SUPPORTING INFORMATION

by ARTHUR DOMINGOS-MELO, PAULO MILET-PINHEIRO, DANIELA MARIA DO AMARAL
FERRAZ NAVARRO, ARIADNA VALENTINA LOPES AND ISABEL CRISTINA MACHADO

Estimative of nectar volume and concentration

In order to estimate the total amount of nectar and sugar produced by flowers across the anthesis, we measured the volume and concentration of nectar using a graduated micro syringe (Hamilton®) and a hand held temperature compensated refractometer (Atago, model MASTER-53α: Brix 0-53%), respectively. Measurements were made from 10 flowers of 10 individuals (N=100 flowers) that were bagged prior to anthesis. To avoid spilling of nectar, we collected nectar three times along the anthesis (19:00-20:00; 23:30-0:30; 2:00-3:00). After measurements, flowers were bagged again to avoid nectar consumption by floral visitors. The total amount of nectar secreted per flower was calculated as the sum of the nectar collected in these three intervals. The amount of sugar in the nectar was calculated following the equation proposed by Galleto and Bernardello (2005).

Based on the estimative above, we calculated the total amount of nectar and sugar produced per individual in one reproductive season. In each of the 10 individuals mentioned above, we estimated the total number of flowers produced in a reproductive season and the total amount of nectar (adapted from Gribel et al. 1999). As we noted that flowers of this species spread homogeneously and only on the external surface of the canopy (Figure S1A), we measured the number of flowers per m² in each individual and multiplied by its total canopy area. To obtain the number of flowers per m², we placed a 0.5x0.5m screen on the canopy (Figure S1B) and count the number of buds, flowers, receptacles and immature fruits. We repeated this procedure two times at four equidistant points from the canopy and use the mean value of flowers per m² (Figure S1B, C). To obtain the surface area of the canopy (S), we analyzed its morphology and assumed that they have a dome shape (Figure 2A). We then estimated their areas through the formula of the surface of a half ellipsoid.

$$2S \approx 4 \left(\frac{a_p b_p + a_p c_p + b_p c_p}{3} \right)^{1/p}$$

The values used in this formula were the constant $p \approx 1.6075$ and the canopy measures obtained through a hypsometer: a (canopy height multiplied by two), b (largest canopy width) and c (lowest canopy width). After that, we multiplied the total number of flowers of an individual by the average amount of nectar produced by individual flowers, as well as by their amount of sugar.

Chemical characterization of flower and nectar scent

In order to investigate whether nectar emit its own scent, we collected headspace samples for thermal desorption (TD) from empty flowers (N=10) and isolated nectar (N=10). For this, nectar was removed from flowers using strips of absorbent paper. The empty flower, as well as its removed nectar, was individually enclosed within PET film oven bags (Bratschlauch, Melitta GmbH, Germany), from which scented air was drawn for 30 min by a membrane pump (Rietschle Thomas, Puchheim, Germany) at a constant flow rate of 200 mL min⁻¹. The air enriched with volatile organic compounds (VOCs) inside the bags was trapped in a thermal desorption filter (TD filter, length, 30 mm; inner diameter, 2.5 mm) containing adsorbent polymer (3 mg), consisting of a 1:1 mixture of TenaxTMTA (80/100 mesh, Supelco, Bellefonte, USA) and CarboxenTM100 (20/40 mesh, Supelco, Bellefonte, USA). To detect environmental contaminants, negative controls (empty bags; N=5) were collected by using the same aforementioned protocol. All TD samples were stored in 2 ml screw cap clear vials at 24°C until chemical analysis.

The TD samples were analyzed on a gas chromatograph coupled to a mass spectrometer (GC–MS; Agilent 7890ATM gas chromatograph, Agilent 5975C Series MSDTM mass spectrometer; Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), equipped with a non-polar HP-5 ms column (Agilent J&W; 30 m × 0.25 mm d.i., 0.25-μm film thickness) and a thermal separation probe (TSP, Agilent Technologies). TD samples were placed into the TSP and injected in split mode (1:1) with the injector temperature set to 250°C. GC oven temperature was set at 40°C for 2 min, then increased at a rate of 4°C min⁻¹ to 230°C. The final temperature was held steady for 5 min. Helium (He) carrier gas flow was maintained at a constant pressure of 7.0 psi. MS Source and quadrupole temperatures were set at 230°C and 150°C, respectively. Mass spectra were taken at 70 eV (in EI mode) with a scanning speed of 1.0 scan-s from m/z 35–350. We identified the compounds by comparing their mass spectra and retention indices with those available from commercial mass spectral libraries (MassFinder 4, NIST11 and Wiley

Registry™ 9th Edition, Adams 2007), integrated in the software Agilent MSD Productivity ChemStation (Agilent Technologies). Whenever possible, the identity of the compounds was confirmed using retention times and mass spectra of authentic standards. The peak areas on the chromatograms were integrated to obtain the total ion current signal, which was used to determine the relative percentages of each compound.

FIGURES AND TABLES - SUPPORTING INFORMATION

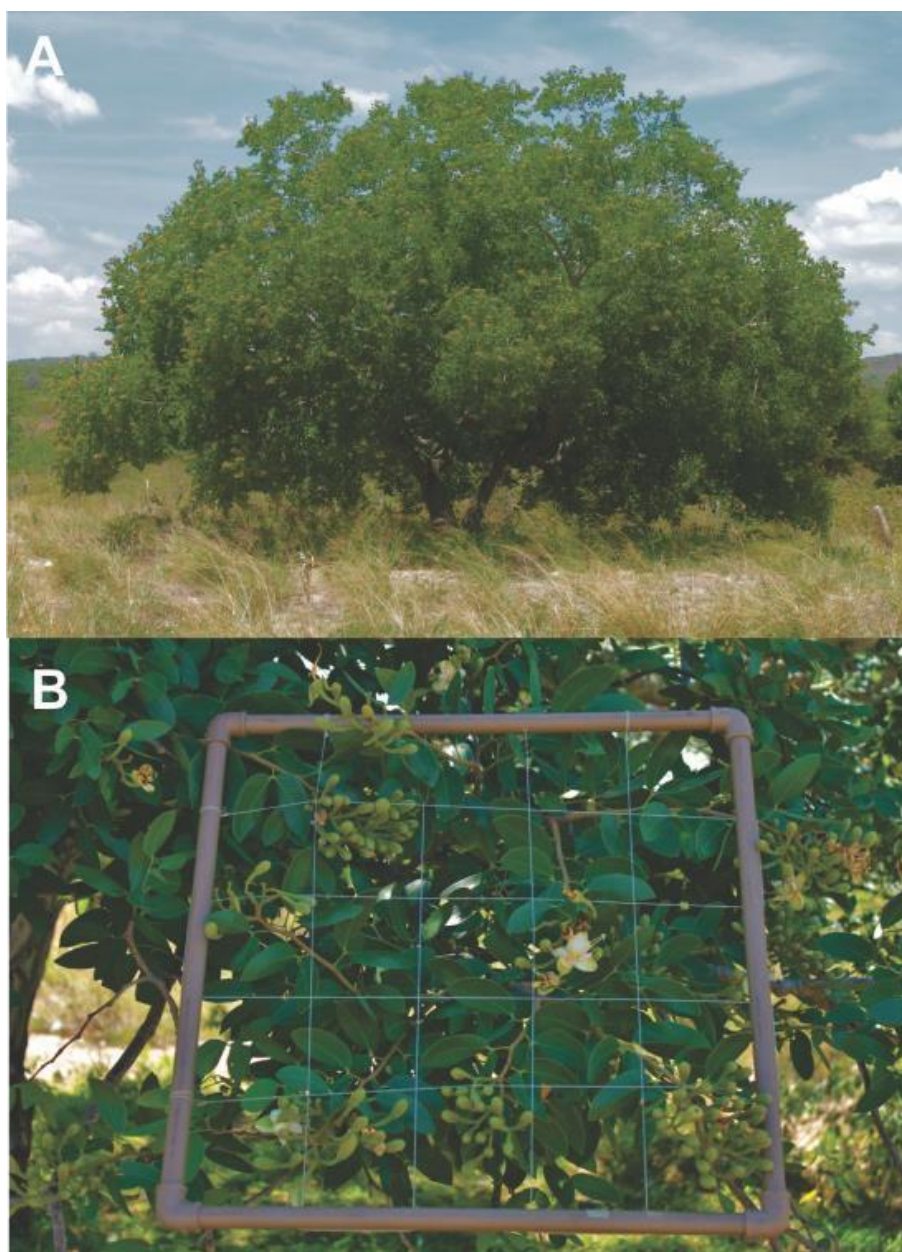


Figure S1 – Flowering tree of *Hymenea cangaceira* (Fabaceae) in the Catimbau National Park. Detail to the habit (A) and inflorescences arrangement under 0.5x0.5m screen (B).

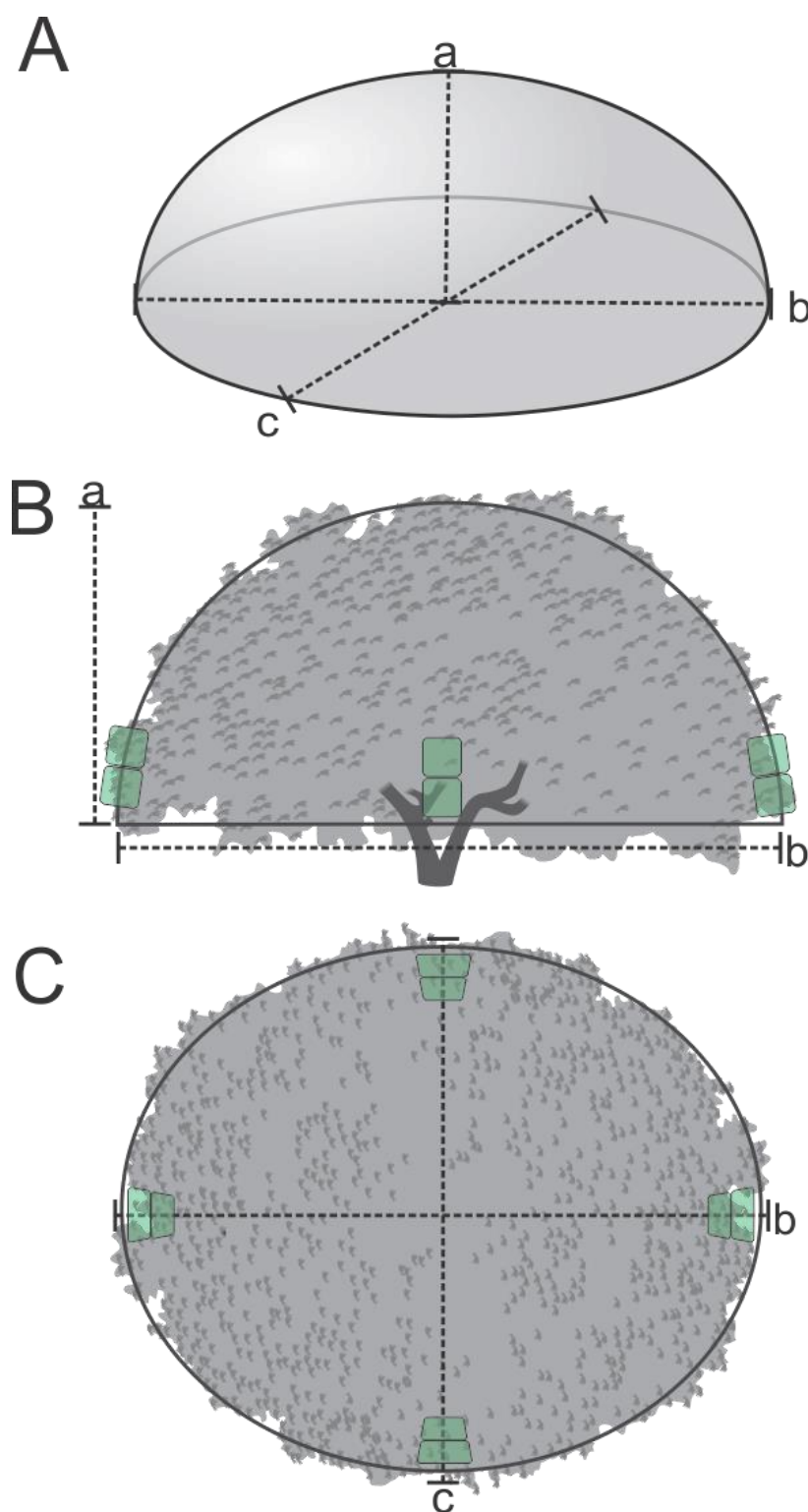


Figure S2 - Half ellipsoid or dome format (A) in comparison to *Hymena canaceira* (Fabaceae) canopy in front (B) and upper (C) view (a - canopy height; b - largest canopy width; c - lowest canopy width; greens squares - area with flowers counted under 0.5x0.5m screen).

Table S1 - Mean relative amount of compounds in the headspace samples of flowers (N=10) and nectar (N=10) of *Hymenaea canaceira* (Fabaceae) in the Catimbau National Park (LRI – retention indices *sensu* Adams (2007); RI – linear retention indices; n – number of samples in

which compounds were recorded; Mean – relative percentage average; SD – standard deviation).

Compound	LRI	RI	N	Mean Flower	SD Flower	N	Mean Nectar	SD Nectar
Aliphatics								
(Z)-3-Hexenyl acetate	1004	1010	5	1.51	3.68	0	0	0.00
(Z)-3-Hexenyl butyrate	1184	1189	1	0.03	0.08	0	0	0.00
Benzenoids and Phenyl Propanoids								
Benzaldehyde	952	960	0	0	0.00	10	1.59	1.20
Benzyl alcohol	1026	1034	2	0.21	0.44	10	1.25	0.57
Methyl benzoate	1088	1095	3	1.44	3.89	5	1.60	2.53
Methyl salicylate	1190	1194	8	2.12	2.41	2	0.06	0.13
3,4-dimethylbenzaldehyde		1215	0	0	0.00	3	0.18	0.33
(Z)-cinnamaldehyde	1217	1220	0	0	0.00	7	1.30	1.12
(Z)-Cinnamyl alcohol	1259	1262	0	0	0.00	1	0.10	0.33
(E)-Cinnamaldehyde	1267	1271	5	1.15	3.20	10	53.59	23.08
(E)-Cinnamyl alcohol	1303	1306	1	0.69	2.18	6	4.57	8.21
Eugenol	1356	1359	0	0	0.00	7	1.08	1.43
(E)-Methyl cinnamate	1376	1385	1	0.09	0.27	8	2.53	4.64
Methyl eugenol	1403	1406	0	0	0.00	1	0.29	0.91
C5-branched chain compounds								
(Z)-3-hexenyl 2methylbutanoate								
	1229	1235	2	0.14	0.35	0	0	0.00
Irregular terpenes								
(E)-4,8-dimethyl-1,3,7-nonatriene		1118	10	5.81	3.50	1	0.07	0.23
Isophorone	1118	1121	0	0	0.00	7	1.59	1.77
Miscellaneous cyclic compounds								
γ -Hexalactone	1042	1055	0	0	0.00	5	0.14	0.18
γ -Octalactone	1250	1260	0	0	0.00	4	0.18	0.26
δ -Octalactone	1276	1286	0	0	0.00	3	0.09	0.15
γ -Decalactone	1465	1469	2	0.52	1.54	10	14.10	9.97

δ -Decalactone	1493	1497	0	0	0.00	7	1.62	1.54
γ -Dodecalactone	1676	1680	0	0	0.00	4	0.47	0.76

Monoterpenes

α -Pinene	932	933	7	2.47	2.84	1	0.02	0.07
Sabinene	969	971	4	0.22	0.29	0	0	0.00
β -Pinene	974	973	5	0.77	1.02	0	0	0.00
β -Myrcene	988	993	7	1.80	1.85	0	0	0.00
p-Cymene	1020	1023	4	1.02	1.49	0	0	0.00
Limonene	1024	1029	6	1.73	2.06	0	0	0.00
(Z)- β -Ocimene	1032	1040	6	0.38	0.49	0	0	0.00
(E)- β -Ocimene	1044	1051	10	9.93	12.00	0	0	0.00
γ -Terpinene	1054	1059	4	0.28	0.45	0	0	0.00
(Z)-Linalool oxide (furanoid)	1067	1070	0	0	0.00	1	0.03	0.08
(E)-Linalool oxide (furanoid)	1084	1090	1	0.10	0.33	4	0.46	1.25
Linalool	1095	1101	1	0.40	1.28	2	0.27	0.75
Terpinen-4-ol	1174	1175	0	0	0.00	2	0.16	0.33
α -Terpineol	1186	1190	0	0	0.00	2	0.09	0.20
Sesquiterpenes α -Copaene	1374	1379	10	14.04	6.08	3	0.40	0.98
β -Cubebene	1387	1393	10	1.49	0.96	3	0.16	0.27
Cyperene	1398	1402	10	6.02	1.64	1	0.02	0.05
(E)-Caryophyllene	1417	1424	10	20.71	6.95	5	1.03	1.45
β -Copaene	1430	1433	9	1.41	1.50	1	0.13	0.40
Germacrene D	1484	1489	10	6.31	7.03	2	0.30	0.82

Unidentified

Unidentified1	965	0	0	0.00	6	0.38	0.50
Unidentified2	1146	3	0.13	0.21	1	0.03	0.08
Unidentified3	1210	4	1.07	2.29	0	0	0.00
Unidentified4	1330	2	0.22	0.61	0	0	0.00
Unidentified5	1340	9	0.87	0.93	1	0.11	0.33
Unidentified6	1352	7	1.15	1.18	0	0	0.00

Unidentified7	1388	2	0.05	0.11	0	0	0.00
Unidentified8	1395	10	2.68	2.12	3	0.16	0.26
Unidentified9	1410	1	0.01	0.03	0	0	0.00
Unidentified10	1416	1	0.02	0.06	0	0	0.00
Unidentified11	1437	4	0.16	0.26	0	0	0.00
Unidentified12	1439	9	0.63	0.36	0	0	0.00
Unidentified13	1442	5	0.14	0.17	0	0	0.00
Unidentified14	1448	5	0.51	0.82	0	0	0.00
Unidentified15	1452	5	0.23	0.29	0	0	0.00
Unidentified16	1457	10	3.48	1.46	0	0	0.00
Unidentified17	1462	4	0.12	0.19	0	0	0.00
Unidentified18	1464	5	0.30	0.32	0	0	0.00
Unidentified19	1467	6	0.34	0.47	0	0	0.00
Unidentified20	1475	5	0.16	0.18	0	0	0.00
Unidentified21	1478	6	0.54	0.66	0	0	0.00
Unidentified22	1479	4	0.65	1.36	0	0	0.00
Unidentified23	1492	3	0.08	0.15	0	0	0.00
Unidentified24	1496	3	0.15	0.32	0	0	0.00
Unidentified25	1501	5	1.11	2.14	0	0	0.00
Unidentified26	1502	3	0.24	0.39	0	0	0.00
Unidentified27	1510	4	0.50	1.03	0	0	0.00
Unidentified28	1514	0	0	0.00	7	9.12	9.89
Unidentified29	1517	5	0.29	0.41	0	0	0.00
Unidentified30	1526	8	1.06	0.86	0	0	0.00
Unidentified31	1540	4	0.10	0.14	0	0	0.00
Unidentified32	1547	2	0.06	0.13	0	0	0.00
Unidentified33	1552	1	0.04	0.12	0	0	0.00
Unidentified34	1566	1	0.02	0.05	0	0	0.00
Unidentified35	1581	1	0.03	0.11	0	0	0.00
Unidentified36	1600	1	0.08	0.24	0	0	0.00
Unidentified37	1603	0	0	0.00	4	0.73	1.25

LITERATURE CITED - SUPPORTING INFORMATION

Adams RP. 2007. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Carol Stream, Illinois: Allured Publishing Corporation.

Galetto, L., and Bernardello, G. 2005. Rewards in flowers: nectar. In: Dafni A., Kevan P.G., and Husband B.C. (Eds.), Practical pollination biology. Cambridge, Ontario: Enviroquest.

Gribel, R., Gibbs, P. E. and Queiroz, A. L. 1999. Flowering phenology and pollination biology of *Ceiba pentandra* (Bombacaceae) in Central Amazonia. Journal of Tropical Ecology, 15: 247-263.

6 MANUSCRITO nº4: UV-REFLECTION AS A CUE IN BAT-POLLINATED FLOWERS

(A ser enviado para a revista Annals of Botany)

Arthur Domingos-Melo¹, Vinícius Lourenço Garcia de Brito², Alicia Sersic³, Andrea A. Cocucci³ and Isabel Cristina Machado^{1,*}

¹Department of Botany, Federal University of Pernambuco, Recife - PE, Brazil

²Institute of Biology, Federal University of Uberlândia, Uberlândia - MG, Brazil

³Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal, Universidad Nacional de Córdoba, CONICET, Cordoba , Argentina

*Correspondence author (imachado@ufpe.br).

ABSTRACT

Background and Aims: Bat-pollination is one of the most recently evolved pollination systems and is characterized by unique traits that match bats' behavioral peculiarities. Considering that Neotropical pollinating bats have dichromatic vision and UV light discrimination, it is expected that bat use UV signals to localize nectar sources.

Methods: We compared the reflection curves of floral structures with and without potential function in visual attraction. Then we analyzed under UV light the reflection patterns of the conspicuous floral structures. And finally, we performed manipulations in flower reflection to verify the effect of UV light reflection on bats visiting behavior in the field.

Key Results: We found that UV reflection allocated to the floral structures is attractive and that it may mainly act as a long-distance and not as an intrafloral cue due to the lack of contrasting color patterns. We also prove experimentally that this reflection enhances bat perception and response to flowers in the field.

Conclusions: Contrary to previous views, our results demonstrate that bat flowers may explore the bat color vision. This unexplored mode of bat-flower signaling opens new perspectives to the understanding of bat-pollination regarding its evolution (importance of

exaptations) and ecology (processes on different levels – e.g. phenotypic selection and facilitation).

Key words: bat vision; chiropterophily; cognitive ecology; color flower; floral attractive; floral traits; plant–animal signaling, pollinator behavior, nocturne pollination; ultraviolet.

INTRODUCTION

It is suggested that pollination by bats appeared during the Cenozoic in concert with the diversification of anthophilous vertebrates (Fisher *et al.*, 2014), and evolved independently in several Angiosperm families, commonly as young divergent clades (Fleming *et al.*, 2009). Beyond the nocturnal anthesis, this is a pollination system with very particular floral attributes (Willmer, 2011). Up to now, scent that stimulates the sensitivity of bats to sulfur compounds (Knudsen and Tollsten, 1995; Helversen *et al.*, 2000) as well as acoustic reflection that exploits their sense of echolocation, unique among pollinators (Helversen and Helversen, 1999; Simon *et al.*, 2011), have been the major traits associated to the attraction of bats by plants pollinated by them. In contrast, the role of colors in these flowers has been neglected due to the nocturnal activity of these pollinators where the light seems to have less importance.

Floral color preferences are mainly influenced by visual perception and also learning abilities of pollinators (Lunau and Maier, 1995; Lunau *et al.*, 2011; Reverté *et al.*, 2016). However, many studies on floral color focus on pollination by insects and birds while neglecting the bat pollination system. Few studies have directed their attention to the attractive role of color in bat-pollination and most of them support the idea that coloration may either function as camouflage or only represents a past adaptation of an ancestral pollination system from which bat-pollinated species evolved (Biedinger and Barthlott, 1993; Fleming *et al.*, 2009). These two possibilities were the only ones considered when UV light reflection was recorded in flowers of some Neotropical bat-pollinated species (Biedinger and Barthlott, 1993).

More recently, studies demonstrated that Neotropical pollinating bats are sensitive to UV and green wavelengths and could have some ability to discriminate colors due to dichromatic vision (Winter *et al.*, 2003; Müller *et al.*, 2009). Therefore, a reevaluation of our understanding of the interaction between flowers and bats mediated by color becomes necessary. It is reasonable to assume that between these two colors bats are sensitive to, UV

reflection has a central role in the attraction of these pollinators, because green light from the leaves and other structures is often the predominant background color. Here we explored the role of UV reflection as a potentially important flower trait, since it could exploit the potential ability of these mammals to see and discriminate color within this range of wavelengths. We described the amount of UV reflected by flowers of bat pollinated species in two levels: i) amount of UV reflection reflected by different floral whorls; ii) flower designs displayed by these UV reflections. Finally, we showed for the first time the functional role of UV reflection in bat-pollinated flowers by experimentally manipulating UV reflection to assess the contribution of UV to bat attraction by flowers.

MATERIALS AND METHODS

Species and study sites

To test the functional role of UV reflection on flowers we sampled 132 flowers. We used each flower as a sample unit for comparison tests between conspicuous and inconspicuous structures (see UV reflection comparison between floral whorls). We attempted to cover the highest inter- and intra-specific variation in the field. For this, we were able to use 14 of about 20 species pollinated by bats which we recorded up to now in the Caatinga vegetation (a tropical dry forest in Northeast Brazil where the proportion of bat pollinated plants is higher than anywhere else in the world; Machado and Lopes 2004; Quirino and Machado 2014). We used three to 15 flowers per species, obtained from 1 to 12 individuals (see Supplementary data – Table 4). The inclusion criterion for these species was to have bats as the single or main pollinator, as could be confirmed in literature or by personal observations. We obtained the reflectance spectra and UV photos in two places: Parque Nacional do Vale do Catimbau (PARNA Catimbau, 8°32'14"S, 37°14'42" W) and Reserva Privada do Patrimônio Natural Fazenda Almas (RPPN Almas, 7° 28'15"S, 36° 53'51" W).

We chose *Tarenaya spinosa* (Cleomaceae) as a model species among the others for the UV reflection manipulation experiment (see UV reflection effect on bat visiting behavior) because it is exclusively pollinated by *Glossophaga soricina* and *Lonchophylla mordax* in sampled places, has high bat visitation frequency, and has white flag-petals as the most attractive structure (Machado *et al.*, 2006). In addition, this species is abundant, easily available, and offers large quantity of flowers. We carried out the experiments of bat preference in the field in two places: RPPN Almas (mentioned above) and in an urban area of the Recife

city – Pernambuco, Brazil (8 ° 3 '15 "S, 34 ° 52' 53" W), where the species forms naturally large populations with similar pollination ecology (Machado *et al.*, 2006).

UV reflection of floral whorls

To describe the UV reflection in different floral whorls we obtained the respective reflection spectra from freshly collected flowers in the field, using a surface spectrophotometer (Jaz, Ocean Optics) coupled with an optic fiber probe; we calibrated with a WS-1 reflection Standards Ocean Optics as white and the absence of light as black. We measured reflection with the probe at an angle of 45° from the flower surface to avoid specular reflection (Chittka and Kevan, 2005).

In a naturalistic approach, it is possible to intuit which whorl of a flower are the most important in the composition of the floral display from the occupied area (Endress, 1994; Willmer 2011). Thus, we compared UV reflection between floral parts that were visually evident (conspicuous) or not evident (inconspicuous) to a bat when approaching a flower. We consider that, if UV reflection has a role in attraction, then areas of UV reflection should be larger and UV reflection more intense in conspicuous as compared with inconspicuous flower parts. To this end, we measured the relative area occupied by conspicuous and inconspicuous flower parts (Table 1) using front view photographs and ImageJ software. Reflection curves of conspicuous and inconspicuous flower surfaces were compared using UV reflection measures both in absolute (average reflection in the UV band) and proportional (UV chroma) terms (Maia *et al.*, 2017).

Color patterns generated by UV reflection

To answer how floral color patterns generated by UV reflection are, we photographed flowers of these same species under UV light and analyzed the reflection patterns in each of their conspicuous floral structures (Costa and Machado, 2012) to determine if these were continuous or discontinuous. This information is important because continuous color patterns discard the possibility of intrafloral visual guides (Biedinger and Barthlott, 1993; Lunau, 2006; Koski and Tia-Lynn, 2014; Papiorek *et al.*, 2016). We did this we collected open flowers in the field and transported them in vases to a UV-light chamber (365 nm - Tecnal Io: TE-540, Piracicaba, Brazil) where we analyzed the UV reflection patterns (Costa and Machado, 2012). Then, we took photographs of flowers of each species in a dark room isolated with UV

protection blackout and a black cloth as background. We photographed flowers with a Canon T3i camera coupled to an 18-55mm lens. First, we shot with a flash (diaphragm in $f / 5.6$, exposure time $1 / 200s$, ISO 200, flash and other automatic settings). Then we photograph the same flower without flash and illuminated with the UV lamp (diaphragm in $f / 5.6$, exposure time 5s, ISO 400, other automatic settings), through fluorescence, these photos provide an inference of locations where UV is reflected.

UV reflection effect on bat visiting behavior

To answer how UV reflection affects the visiting behavior of bats in nature, we conducted an experiment on bat behavior in the field. For this, we manipulated the flower petals of *Tarenaya spinosa* (Cleomaceae) controlling UV reflection (Johnson and Andersson, 2002). We performed manipulations in flower reflection in the field using an UV-absorbing gel to verify the effect of UV light reflection on bats visiting behavior (adapted from Johnson and Andersson 2002). We used cotton swabs to lightly coat *Tarenaya spinosa*'s petals with different substances. In non-UV-Flowers, UV-absorbing covering consisted of sunscreen pigment FPS22 dissolved in Carbopol gel solvent. We had two types of control flowers: UVFlowers coated only with Carbopol gel without the UV-absorbing sunscreen pigment and the unmanipulated Natural-Flowers. The Carbopol gel and UV-absorbing chemicals are scent-less not adding components to the flower's natural scent. We manipulated flowers before 5:00 PM, one hour before nightfall. At this time of the day petals started to open and the bats were not foraging yet. To confirm the effect of the manipulation on the reflection spectra, we repeated the reflection measurements on the manipulated flowers as described above ($n=15$ flowers of different individuals / one petal per treatment).

To check the effect of the UV manipulation on bat behavior, we manipulated inflorescences directly on sets of shrubs in the field and recorded bat behavior at the beginning of their recognition flights. Each shrub set had an equal number of inflorescences per treatment (one, three or 10 each). We changed the position of the treatments when we used the same shrub set in more than one night. Each turn that bats approached to a shrub set, we recorded which flowers were visited and their treatment. From these data we measured the time spent until the first visit to each inflorescence and the number of visits per treatment. We spend 32 hours in observation during seven nights (six hours in Recife city and 26 hours in RPPN Almas). We observed a total of 87 inflorescences with two to five open flowers each totalizing 272 flowers on seven shrub sets, three in Recife city and four in RPPN Almas.

We hypothesize that bats would visit the UV-reflecting flowers earlier and more frequently than non-UV-Flowers. The time spent between an approach to a shrub set and a flower visit is an indication of the effectiveness with which bats detect a flower. The frequency (number of choices between manipulated flowers at each approach) indicates their preference among flowers. We were not able to distinguish if visits to a flower were performed by the same bat individual, that is why we compared the number of visits rather than number of individual bats visiting a flower in each approach.

Statistical analyzes

To describe UV reflection, we analyzed the data with *pavo* package in R software (Maia *et al.*, 2017). We obtained mean reflection in the UV band and the UV chroma from 300nm to 400nm. These parameters indicate how much light in the UV range is reflected and the relative contribution of the UV spectral range to the total brightness respectively.

We compared each metric (mean UV reflectance and UV chroma) in conspicuous and inconspicuous structures in each flower. The mean reflection and chroma values were pairwise compared using a Beta regression from *betareg* package in the R software (Cribari-Neto and Zeileis, 2010). Conspicuousness was considered a fixed factor whereas species, specimen and flower were considered random factors. We used the same metrics to check the effect of UVfilter and carbopol gel in the reflection of *Tarenaya spinosa*.

We used a generalized linear mixed model with a posterior Tukey test to compare differences between treatments. We used a Poisson distribution to compare the time spent until the first visit and a Binomial distribution to compare the choices between treatments at each approach. In both cases, we used the treatment as the fixed factor and flower number, shrub set and the night of observation as random factors. For choice test, we used the approach of the bat to the flowers set as additional random factor. We performed both tests using the *lme4* package (Zeileis and Hothorn, 2002).

RESULTS

UV reflection on floral whorls

Conspicuous floral structures are larger (Table1) and have higher overall reflection than inconspicuous ones (Fig. 1). Reflection is higher, even though it may belong to different flower

parts (petals, sepals, filaments or anthers). Conspicuous parts have higher reflection average in the UV band in most species ($e=0.06522$; $t=11.83$; $p<0.0001$) (Fig. 3A). Curves of conspicuous and inconspicuous structures have similar shapes, but those of inconspicuous structures are lower (less bright) (Fig. 1). Conspicuous structures also have a higher UV chroma (UV proportion in reflectance) in most species ($e=0.05754$; $t=4.279$; $p<0.0001$) (Fig. 3B).

Color patterns generated by UV reflection

All flowers have continuous UV reflection patterns, since UV reflection is uniformly distributed on conspicuous structures and no pattern or color gradient independent from flower shape is evident in the studied species (Fig. 2). Even in the case of the studied Cactaceae species where the anthers at the center of the flower reflect more UV, there are no evident patterns that combine areas with and without UV reflection.

UV reflection effect on bat visiting behavior

The use of gel to manipulate flower color reflection was successful since, we found differences in UV reflection between flowers with UV blocker and without UV blocker (UV average: $se=41.75$; $z=4.67$; $p<0.0001$; UV chroma: $se=89.95$; $z=4.64$; $p<0.0001$) (Fig. 4). Even if they had different UV average, the UV chroma was similar between Natural-Flowers and UV-flowers. In turn, both Natural-Flowers and UV-flowers had higher UV reflection than the non-UV-Flowers.

We observed bats starting to fly over *Tarenaya spinosa* plants at twilight, 30 minutes before nightfall. Closer flights and visits to flowers began soon after sunset. We recorded 502 visits that occurred along to 363 bat approaches to plants. In each of these approaches, bats visited flowers belonging to one, two or the three treatments, resulting in visits unequally distributed among all treatments.

Our experiments showed that bats use flower UV reflection, since they were more likely to sooner visit flowers that reflected UV, regardless of the presence of gel on the petals ($\chi^2=130.75$; $df=2$; $p<0.0001$) (Fig. 5 A). The gel alone affects the behavior of bats because it increased the time spent until the first visit in UV-Flowers compared to Natural-Flowers ($se=0.06633$; $z=6.217$; $p<0.0001$). However, the time spent until the first visit to non-UVFlowers was in average larger than both Natural-Flowers ($se=0.07961$; $z=11.370$; $p<0.0001$) and UV-Flowers ($se=0.06390$; $z=7.711$; $p<0.0001$).

Consistently, the number of visits to UV reflective flowers was higher than to UV absorbing ones ($\chi^2 = 119.82$; $df=2$; $p<0.0001$) (Fig. 5 B). The gel alone decreased the number of visits in the UV-Flowers treatment compared to Natural-Flowers ($se=0.1526$; $z=7.506$; $p<0.0001$). However, the non-UV-Flowers treatment received fewer visits compared to Natural-Flowers ($se=0.1602$; $z=-10.640$; $p<0.0001$) and UV-Flowers ($se=0.1572$; $z=3.554$; $p=0.001$).

DISCUSSION

Although UV reflection in some bat pollinated flowers has been known for more than two decades (Biedinger and Barthlott, 1993), this is the first study that explores this feature to understand its functioning. The more recent discovery of dichromatic vision and sensitivity to UV light in bats (Winter *et al.* 2003; Müller *et al.*, 2009) and latest advances in understanding how flower colors mediate the interaction with pollinators allowed us to test the hypothesis we present here. Supported by our data we concluded that UV reflection has an attractive function in bat flowers, based on two points: i) The floral parts that reflect UV suggest functionality and ii) experimental confirmation of the effect of UV reflection on bat attraction.

Floral UV reflection suggest functionality

Floral structures may have different functions, some perform photosynthesis and protect other whorls (Aschan and Pfanz 2003) or act mainly on the morphological adjustment to pollinator body (Armbruster *et al.* 2009), while others play a primary role in pollinator attractiveness. Usually the attractive function in flowers concentrates specifically on the corollas (Endress 1994), although they may be aided or replaced by other floral whorls (such as sepals or stamens - Ibanez *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2013), or extrafloral structures (such as bracts or glands - Bolstad *et al.*, 2010). These structures have signaling features such as larger surfaces in relation to other floral parts (Table1) (Endress, 1994; Willmer 2011). Another characteristic of these attractive structures is that the colors discriminated by the respective pollinators are more intense when compared with the other whorls (Endress, 1994; Willmer, 2011). Since every floral structure that we classified as conspicuous was larger and had higher UV reflection regardless of the floral whorl to which they belonged, we have evidence that associates UV reflection with attraction of pollinating bats .

That lack of flower UV patterns provides insight about the functional meaning of color reflection in the present case (Lunau, 2006). UV reflection on flowers with nectar guides frequently exhibit designs or color gradients within a flower regardless the floral architecture

and shape (Jones and Buchmann, 1974; Biedinger and Barthlott, 1993; Dyer, 1996; Sasaki and Takahashi, 2002; Koski and Tia-Lynn, 2014). This information is used by different animals when approaching to or moving within a flower to get oriented to specific locations where the floral resources are found (Scogin, 1978; Penny, 1983; Lunau, 2006). On the other hand, if pollinators do not use intra-floral visual cues, they can be guided to the location of the reward only by floral morphology (Smith *et al.*, 1996; Temeles and Rankin, 2000). In this context, the UV reflection frequently is uniform since it acts only as long-distance attractant (Papiorek *et al.*, 2016). The lack of specific reflection patterns suggest that UV reflection in bat pollinated flowers is only important in long-distance signaling. The lack significance of short distance visual cues for bats is further consistent with the visual capabilities of bat (Surlykke *et al.*, 2016). In fact, bats perform very swift visits (Tschapka *et al.*, 2015) and, therefore, seem not to be able to analyze small scale color patterns within flowers. Additionally, bats already have the echolocation sense, an efficient location system for a short-distance echo acoustic floral detection (Surlykke *et al.*, 2016; Gonzalez-Terrazas *et al.*, 2016).

Experimental confirmation of the effect of UV reflection on bat attraction.

Beyond the interpretation of the UV reflectance as floral attraction trait, we present experimental evidence that bats use this information during their foraging. It has been observed that bats perform recognition flights at dusk (Sazima *et al.*, 2003; Sanmartin-Gajardo and Sazima, 2005) and that the proportion of UV light available in the environment is higher during this time (Johnsen *et al.*, 2006; Borges *et al.*, 2016). Under twilight illumination the use of UV signaling and perception is advantageous both for flowers and bat, respectively. The routes established by bats during twilight by visiting a succession of flowers could be repeated throughout the night since bats have a good spatial memory and record the availability of rewards in space (Henry and Stoner, 2011). Thus, since UV reflectance enhances bat visits, higher fitness (pollination and fruit set) is likely attained by UV reflecting plants. Although it is possible that other wavelengths may aid in floral attractiveness by increasing the overall brightness of the flower, UV reflection appears to be particularly determinant. Probably because the peak sensitivity of bats occurs in the UV and green band (Winter *et al.*, 2003; Müller *et al.*, 2009), but as green is usually the color of the leaves the UV should assume a central role in batflowers color contrast.

Evolutionary and ecological perspectives

Once the functionality of UV reflection in flower signaling for bats was confirmed, some perspectives may be pointed out. To consider that pollinating bats use visual information in their foraging is a paradigm shift that has both evolutionary and ecological implications, which we discuss below.

Bat pollination is the most recently evolved pollination system (Fisher *et al.*, 2014; Fleming *et al.*, 2009) mainly from entomophilous and ornithophilous plants (Tripp and Manos, 2008; Fleming *et al.*, 2009; Lagomarsino *et al.*, 2017). Recent acquisition of bat pollination represents an important step in the evolutionary history of Angiosperms, because bat pollination is subjected to few reversals. Such unidirectional evolutionary changes are presumably explained because the pollination efficiency of bats higher than other animals make plants strongly reliant on bat pollination (Tripp and Manos, 2008; Fleming *et al.*, 2009; Muchhala and Thomson, 2010). On the one hand, a large number of presumptive bird and insect pollinated ancestors of bat pollinated species have UV reflective flowers (Biedinger and Barthlott, 1993; Lunau *et al.*, 2011; Papiorek *et al.*, 2016). On the other hand, the ability of bats to see UV is an ancestral characteristic conserved in nocturnal mammals (Douglas and Marshall, 1999; Fujun *et al.*, 2012). Consequently, compared to the acquisition of sulphurcontaining compounds in the evolution of floral scents and the appearance of features for acoustic reflection, evolution of visual floral signals adjusted to bat vision would have required much less demanding biochemical and morphological adaptations (Knudsen and Tollsten, 1995; Helversen and Helversen, 1999; Helversen *et al.*, 2000; Simon *et al.*, 2011). Thus, it is parsimonious to consider that major adjustments between flower UV signaling and UV recognition by bats were not necessary for a true adaptation along evolutionary history. We believe that future studies should aim to test the idea that UV reflection has been the first signal mediating the interaction between flowers and bats, presumably as an exaptation (Gould and Vrba, 1982) of the function for attracting other pollinators.

Ecological processes that act in the maintenance of this attribute may occur at the population and community level. At population level it is possible to consider the processes of phenotypic selection mediated by pollinators (Irwin and Strauss, 2004; Hopkins and Rausher, 2012). In this context, an increase of a floral signal would affect pollinator behavior, producing an increase in fitness (Schaefer *et al.*, 2004). Thus, in flowers pollinated by bats we would expect a positive relationship between the amount of UV reflection in the flowers and both female and male fitness (for selection on flower color in other systems see Campbell *et al.*, 1997; Campbell *et al.*, 2012).

At the community level, it is important to consider inter-specific relations between plants and environmental filters (Arnold *et al.*, 2009; Muchhala *et al.*, 2014). Considering the effects only among plants pollinated by bats, we believe that the UV signaling could promote facilitation processes, e.g. when flowers of different species have similar displays benefiting each other by jointly attracting more pollinators (Ghazoul, 2006). Facilitation seems more likely than competition among bat pollinated plants, because they usually occur at low densities and bats need a lot of flowers to supply their high energy consumption (Fleming and Muchhala, 2008; Fleming *et al.*, 2009).

Conclusions

We show that UV reflection plays an important role in flower signaling to bats and we clarify further aspects of this interaction. UV signaling predominates in flower visual display both in size and amount of UV reflection. UV reflection is continuous on conspicuous floral structures suggesting a role in long-distance rather than short-distance attraction. Finally, UV signalling makes bats to visit UV-reflecting flowers firstly and more often than non-UV reflecting flowers. These results change our understanding of how bat-pollination systems work and open up a vast field of study including evolutionary, functional and ecological perspectives. Bat pollination is one of the most easily predicted systems based on flower traits due its very peculiar characteristics (Fleming *et al.*, 2009; Muchhala *et al.*, 2014; Rosas-Guerrero *et al.*, 2014). Here, we add UV reflection as another trait likely very important in bat pollination, despite that it had long been recognized for other pollination systems. The role of UV reflection in bat pollination has been neglected until now probably due to our own perception biases and to the no longer standing paradigm that bats do not see well as a consequence of their nocturnal way of life. We stress that UV perception of bats from now should be included in cognitive pollination ecology studies.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank to PELD-Catimbau (Programa de Pesquisa Ecológica de Longa Duração), CNPq 459485/2014-8 (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco) that supported this research; to Departamento de Farmácia da UFPE that prepared and donated the gels for the experiment; to William Wayt Thomas who kindly revised the English; to RPPN Fazenda Almas where part of the study was developed and Roberto Lima who provided logistical support in

this field; and to Diego Sotero Pinagé, Ugo Diniz, Sinzinando Albuquerque and Antônio Félix da Silva Filho who helped in the field work; to Mani Shrestha who assisted with the processing and interpretation of the reflectance data and an anonymous reviewer for valuable comments. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

LITERATURE CITED

Armbruster WS, Hansen TF, Pélabon C, Pérez-Barrales R, Maad J. 2009. The adaptive accuracy of flowers: measurement and microevolutionary patterns. *Annals of Botany* **103**: 1529-1545.

Arnold SE, Savolainen V, Chittka L. 2009. Flower colours along an alpine altitude gradient, seen through the eyes of fly and bee pollinators. *Arthropod-Plant Interactions* **3**: 27-43.

Aschan G, Pfanz H. 2003. Non-foliar photosynthesis—a strategy of additional carbon acquisition. *Flora* **198**: 81-97.

Biedinger N, Barthlott W. 1993. Untersuchungen zur Ultraviolettreflexion von Angiospermenblüten I. Monocotyledoneae. *Tropische und subtropische Pflanzenwelt* **86**: 1122.

Bolstad GH, Armbruster WS, Pélabon C, Pérez, Barrales R, Hansen TF. 2010. Direct selection at the blossom level on floral reward by pollinators in a natural population of *Dalechampia schottii*: full disclosure honesty? *New Phytologist* **188**: 370-384.

Borges RM, Somanathan H, Kelber A. 2016. Patterns and processes in nocturnal and crepuscular pollination services. *The Quarterly Review of Biology* **91**: 389-418.

Brock, MT *et al.* 2016. Genetic architecture, biochemical underpinnings and ecological impact of floral UV patterning. *Molecular Ecology* **25**: 1122-1140.

Campbell DR, Waser NM, Melendez-Ackerman EJ. 1997. Analysing pollinator-mediated selection in a plant hybrid zone: hummingbird visitation patterns on three spatial scales. *The American Naturalist* **149**: 295-315.

Chittka L, Kevan PG. 2005. Flower colours as advertisement. In *Practical Pollination Biology* (ed. Dafni A, Kevan PG, Husband BC) 157-230 (Enviroquest Press)

Costa ACG, Machado IC. 2012. Flowering dynamics and pollination system of the sedge *Rhynchospora ciliata* (Vahl) Kükenth (Cyperaceae): does ambophily enhance its reproductive success? *Plant Biology* **14**: 881-887.

- Cribari-Neto F, Zeileis A. 2010. Beta regression in R. *Journal of Statistical Software* **34**: 1–24.
- Douglas RH, Marshall NJ. 1999. in: *Adaptive Mechanisms in the Ecology Vision* (eds Archer SN, Djamgoz MBA, Loew ER, Partidge JC, Vallerga S) 95-162 (Springer Verlag).
- Dyer AG. 1996. Reflection of near-ultraviolet radiation from flowers of Australian native plants. *Australian Journal of Botany* **44**: 473-488.
- Endress PK. 1994. Diversity and evolutionary biology of tropical flowers (Cambridge University Press).
- Fisher E, Araújo CA, Gonçalves F. 2014. Polinização por vertebrados. in Rech AR, Agostini K, Oliveira PE, Machado IC. *Biologia da polinização* (Projecto Cultural).
- Fleming TH, Geiselman C, Kress WJ. 2009. The evolution of bat pollination: a phylogenetic perspective. *Annals of Botany* **104**: 1017-1043.
- Fleming TH, Muchhala N. 2008. Nectar-feeding bird and bat niches in two worlds: pantropical comparisons of vertebrate pollination systems. *Journal of Biogeography* **35**: 764-780.
- Frey FM. 2007. Phenotypic integration and the potential for independent color evolution in a polymorphic spring ephemeral. *American Journal of Botany* **94**: 437-444.
- Fujun X, Kailiang H, Tengting Z, Paul R, Xuzhong W, Yi S. 2012. Behavioral evidence for cone-based ultraviolet vision in divergent bat species and implications for its evolution. *Zoologia* **29**: 109-114.
- Ghazoul J. 2006. Floral diversity and the facilitation of pollination. *Journal of Ecology* **94**: 295-304.
- Gonzalez-Terrazas TP *et al.* 2016. Finding flowers in the dark: nectar-feeding bats integrate olfaction and echolocation while foraging for nectar. *Royal Society Open Science*: DOI: 10.1098/rsos.160199
- Gould SJ, Vrba ES. 1982. Exaptation—a missing term in the science of form. *Paleobiology* **8**: 4-15.
- Henry M, Stoner KE. 2011. Relationship between spatial working memory performance and diet specialization in two sympatric nectar bats. *PloS one* <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0023773>
- Holton TA, Cornish EC. 1995. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *The Plant Cell* **7**: 1071.

Hopkins R, Rausher MD. 2012. Pollinator-mediated selection on flower color allele drives reinforcement. *Science* **335**: 1090-1092.

Ibanez S *et al.* 2010. The role of volatile organic compounds, morphology and pigments of globe flowers in the attraction of their specific pollinating flies. *New Phytologist* **188**: 451-463.

Irwin RE, Strauss SY. 2004. Flower color microevolution in wild radish: evolutionary response to pollinator-mediated selection. *The American Naturalist* **165**: 225-237.

Johnsen S *et al.* 2006. Crepuscular and nocturnal illumination and its effects on color perception by the nocturnal hawkmoth *Deilephila elpenor*. *Journal of Experimental Biology* **209**: 789-800.

Johnson SD, Andersson S. 2002. A simple field method for manipulating ultraviolet reflectance of flowers. *Canadian Journal of Botany* **80**: 1325-1328.

Jones CE, Buchmann SL. 1974. Ultraviolet floral patterns as functional orientation cues in hymenopterous pollination systems. *Animal Behaviour* **22**: 481-485.

Knudsen JT, Tollsten L. 1995. Floral scent in bat-pollinated plants: a case of convergent evolution. *Botanical Journal of the Linnean Society* **119**: 45-57.

Koski MH, Tia-Lynn A. 2014. Dissecting pollinator responses to an ubiquitous ultraviolet floral pattern in the wild. *Functional Ecology* **28**: 868-877.

Lagomarsino LP, Forrestel EJ, Muchhala N, Davis CC. 2017. Repeated evolution of vertebrate pollination syndromes in a recently diverged Andean plant clade. *Evolution* **71**: 1970–1985.

Liu L *et al.* 2013. A study on the attractive function of different floral structures in *Trollius ranunculoides* (Ranunculaceae). *Acta Prataculturae Sinica* **3**: 26.

Lunau K, Maier EJ. 1995. Innate colour preferences of flower visitors. *Journal of Comparative Physiology A* **177**: 1-19.

Lunau K, Papiorek S, Eltz T, Sazima M. 2011. Avoidance of achromatic colours by bees provides a private niche for hummingbirds. *Journal of Experimental Biology* **214**: 1607-1612.

Lunau K. 2006. Stamens and mimic stamens as components of floral colour patterns. *Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie* **127**: 13-41.

Machado IC, Lopes AV, Leite AV, Neves CB. 2006. *Cleome spinosa* (Capparaceae): Polygamodioecy and pollination by bats in urban and Caatinga areas, northeastern Brazil. *Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie* **127**: 69-

82.

Machado IC, Lopes AV. 2004. Floral traits and pollination systems in the Caatinga, a Brazilian tropical dry forest. *Annals of Botany* **94**: 365-376.

Maia R *et al.* 2017. Package ‘pavo’ – Perceptual Analysis, Visualization and Organization of Spectral Color Data in R. *The Comprehensive R Archive Network*

Muchhala N, Johnsen S, Smith SD. 2014. Competition for hummingbird pollination shapes flower color variation in Andean Solanaceae. *Evolution* **68**: 2275-2286.

Muchhala N, Thomson JD. 2010). Fur versus feathers: pollen delivery by bats and hummingbirds and consequences for pollen production. *The American Naturalist* **175**: 717-726.

Müller B *et al.* 2009. Bat eyes have ultraviolet-sensitive cone photoreceptors. *PLoS One* <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0006390>

Papiorek S *et al.* 2016. Bees, birds and yellow flowers: pollinator dependent convergent evolution of UV patterns. *Plant Biology* **18**: 46-55.

Penny JHJ. 1983. Nectar guide colour contrast: a possible relationship with pollination strategy. *New phytologist* **95**: 707-721.

Queiroz JA, Quirino ZGM, Lopes AV, Machado IC. 2016. Vertebrate mixed pollination system in *Encholirium spectabile*: a bromeliad pollinated by bats, opossum and hummingbirds in a tropical dry forest. *Journal of Arid Environments* **125**: 21-30.

Quirino ZGM, Machado IC. 2014.

Reverté S, Retana J, Gómez JM, Bosh J. 2016. Pollinators show flower colour preferences but flowers with similar colours do not attract similar pollinators. *Annals of Botany* **118**: 249-257.

Rocha EA, Machado IC, Zappi DC. 2007. Floral biology of *Pilosocereus tuberculatus* (Werderm.) Byles & Rowley: a bat pollinated cactus endemic from the “Caatinga” in northeastern Brazil. *Bradleya* **25**: 129-160.

Rosas-Guerrero V *et al.* 2014. A quantitative review of pollination syndromes: do floral traits predict effective pollinators? *Ecology Letters* **17**: 388-400.

Sanmartin-Gajardo I, Sazima M. 2005. Chiropterophily in Sinningieae (Gesneriaceae): *Sinningia brasiliensis* and *Paliavana prasinata* are bat-pollinated, but *P. sericiflora* is not. Not yet? *Annals of Botany* **95**: 1097-1103.

Sasaki K, Takahashi T. 2002. A flavonoid from Brassica rapa flower as the UVabsorbing nectar guide. *Phytochemistry* **61**: 339-343.

Sazima M, Buzato S, Sazima I. 2003. *Dyssochroma viridiflorum* (Solanaceae): a reproductively bat-dependent epiphyte from the Atlantic rainforest in Brazil. *Annals of Botany* **92**: 725-730.

Schaefer HM, Schaefer V, Levey DJ. 2004. How plant–animal interactions signal new insights in communication. *Trends Ecology & Evolution* **19**: 577-584.

Scogin R. 1978. Floral UV-absorption patterns and anthochlor pigments in the Asteraceae. *The Southwestern Naturalist* **23**: 371-374.

Simon R, Holderied MW, Koch CU, von Helversen O. 2011. Floral acoustics: conspicuous echoes of a dish-shaped leaf attract bat pollinators. *Science* **333**: 631-633.

Smith CE, Stevens JT, Temeles EJ, Ewald PW, Hebert RJ, Bonkovsky RL. 1996. Effect of floral orifice width and shape on hummingbird-flower interactions. *Oecologia* **106**: 482-492.

Surlykke A, Simmons JA, Moss CF. 2016. Perceiving the world through echolocation and vision. in Fenton MB, Grinnell AD, Popper AN, Fay RR. *Bat Bioacoustics* (Springer).

Temeles EJ, Rankin AG. 2000. Effect of the lower lip of *Monarda didyma* on pollen removal by hummingbirds. *Canadian Journal of Botany* **78**: 1164-1168.

Tripp EA, Manos PS. 2008. Is floral specialization an evolutionary dead-end? pollination system transitions in *Ruellia* (Acanthaceae). *Evolution* **62**: 1712-1737.

Tschapka M, Gonzalez-Terrazas TP, Knörnschild M. 2015. Nectar uptake in bats using a pumping-tongue mechanism. *Science Advances* **1**: e1500525

Vogel S, Lopes AV, Machado IC. 2005. Bat pollination in the NE Brazilian endemic *Mimosa lewisii*: an unusual case and first report for the genus. *Taxon* **54**: 693-700.

Vogel S, Machado IC, Lopes AV. 2004. *Harpochilus neesianus* and other novel cases of chiropterophily in Neotropical Acanthaceae. *Taxon* **53**: 55-60.

von Helversen D, von Helversen O. 1999. Acoustic guide in bat-pollinated flower. *Nature* **398**: 759-760.

von Helversen O, Winkler L, Bestmann HJ. 2000. Sulphur-containing “perfumes” attract flower-visiting bats. *Journal of Comparative Physiology A* **186**: 143-153.

Weiss D. 2000. Regulation of flower pigmentation and growth: multiple signaling pathways control anthocyanin synthesis in expanding petals. *Physiologia Plantarum* **110**: 152-157.

Willmer P. 2011. *Pollination and Floral Ecology* (Princeton University Press) Winter Y, Lopez J, von Helversen O. 2003. Ultraviolet vision in a bat. *Nature* **425**: 612– 614.

Zeileis A, Hothorn T. 2002. Diagnostic Checking in Regression Relationships. *R News* **2**, 7-10.

TABLES

Table 1 - Bat pollinated species used for UV reflection comparison between conspicuous and inconspicuous floral structures.

<u>Family</u>	Floral	Flower Structures	
		(% approximate occupied area in floral display - front view)	
Species (n=flowers/plants)	Types**	Conspicuous	Inconspicuous
<u>Acanthaceae</u>			
<i>Harpochilus neesianus</i> ¹ (n=15/13)	Gullet	Lips (80%)	Tube (15%) Cl (5%)
<u>Bromeliaceae</u>			
<i>Encholirium spectabile</i> ² (n=10/2)	Brush (Ps)	Cr (95%)	Cl (5%)
<u>Cactaceae</u>			
<i>Pilosocereus tuberculatus</i> ³ (n=10/7)	Funnel	Cr (60%) An (30%)	Hp (10%)
<i>Pilosocereus pachycladus</i> * (n=5/4)	Funnel	Cr (60%) An (30%)	Hp (10%)
<u>Capparaceae</u>			
<i>Crataeva tapia</i> * (n=10/3)	Brush (Ps)	Cr (75%)	Fl (15%) Cl (10%)
<i>Cynophalla flexuosa</i> * (n=15/10)	Brush	Fl (75%) Cr (20%)	Cl (5%)
<i>Neocalyptrocalyx longifolium</i> * (n=10/5)	Brush	Fl (85%)	Cl (5%) Cr (10%)
<u>Cleomaceae</u>			
<i>Tarenaya spinosa</i> ⁴ (n=15/5)	Flag	Cr (85%)	Fl (10%) Cl (5%)
<u>Fabaceae</u>			
<i>Bauhinia acurana</i> * (n=3/1)	Flag	Cl (70%)	Hp (0%) Cr (15%) Fl (15%)

<i>Bauhinia cheilantha</i> * (n=5/5)	Flag	Cr (85%)	Hp (0%) Cl (10%) Fl (5%)
<i>Bauhinia pentandra</i> * (n=15/5)	Flag	Cl (70%)	Hp (0%) Cr (15%) Fl (15%)
<i>Hymenaea cangaceira</i> * (n=15/4)	Dish	Cl (55%) Cr (30%)	Hp (0%) Fl (15%)
<i>Mimosa lewisii</i> ⁵ (n=9/8)	Brush (Ps)	Fl (65%) An (25%)	Cr (10%) Cl (0%)
<u>Malvaceae</u>			
<i>Ceiba glaziovii</i> * (n=15/3)	Dish	Cr (90%)	Fl (10%) Cl (0%)

*Bat pollination recorded by personal observations, other numbers indicate bat pollination records in the literature;

**Sensu Faegri and Pijl 1979;

¹Vogel et al 2004; ²Queiroz et al 2016, ³Rocha et al 2007, ⁴Machado et al 2006, ⁵Vogel et al 2005

(abbreviations: Cr – Corolla; Cl – Calyx; An - Anther; Hp – Hypanthium; Fl – Filaments; Ps - Pseudanthium)

FIGURES AND LEGENDS

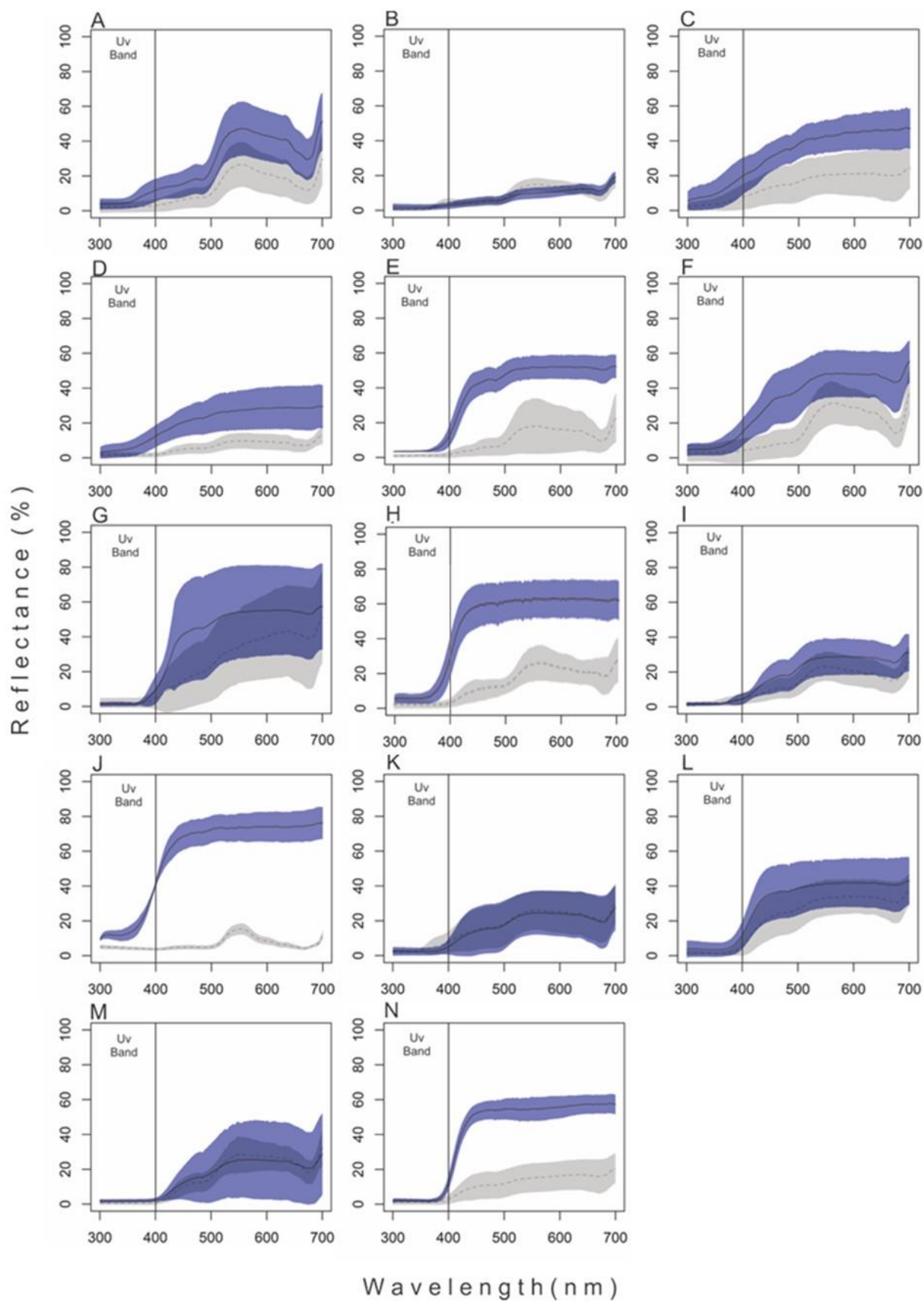


Figure 1 – Reflectance curves of conspicuous (violet) and inconspicuous (gray) floral structures of the studied species: A – *Harpochilus neesianus* (Acanthaceae); B – *Encholirium*

spectabile(Bromeliaceae); C – *Pilosocereus tuberculatus*, D - *P. pachycladus*(Cactaceae); E – *Crataeva tapia*, F -*Cynophalla flexuosa*, G – *Neocalyptro calyxlongifolium*(Capparaceae);H – *Tarenaya spinosa* (Cleomaceae); I - *Bauhinia acuruana*, J - *B. cheilantha*, K - *B. pentandra*, L – *Hymenaea cangaceira*, M - *Mimosa lewisii* (Fabaceae); N - *Ceiba glaziovii*(Malvaceae); (Continuous line and dashed lines: Mean reflectance curve; shaded areas:standard deviation).

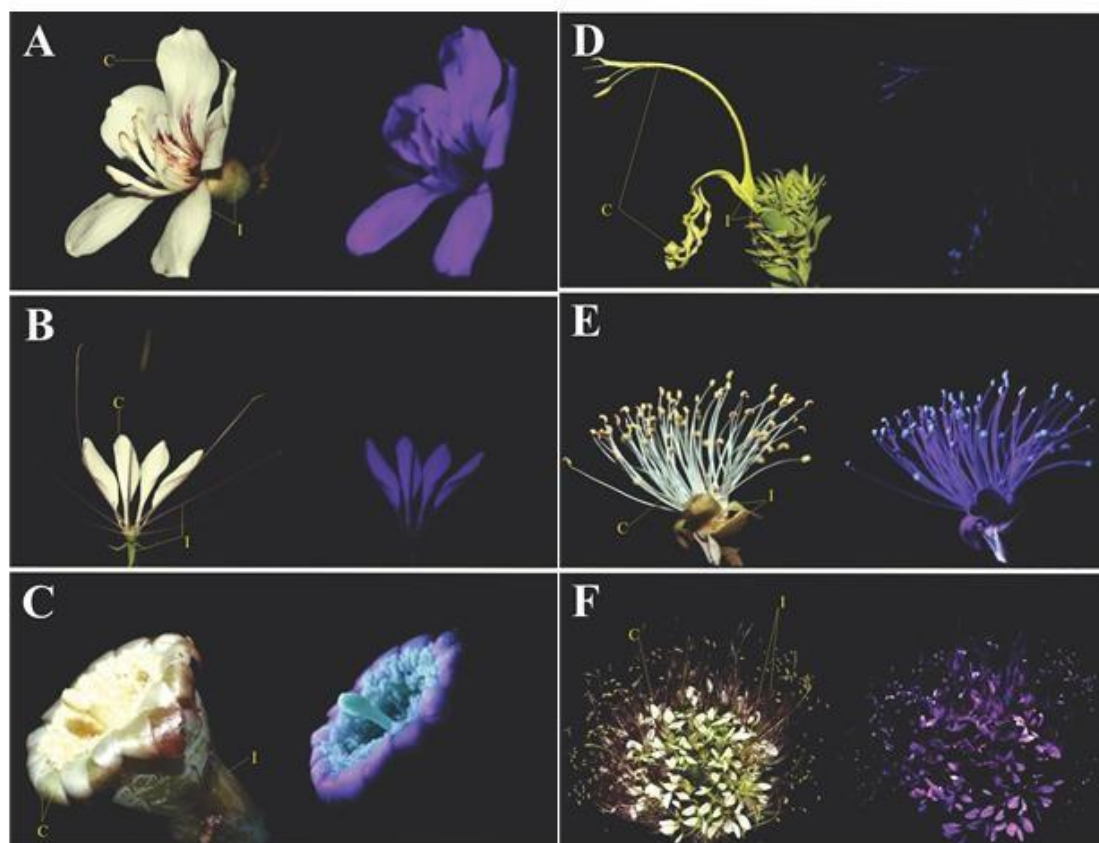


Figure 2 – Examples of different floral types in bat pollinated flowers (left) and their respective UV reflection images (right). (A) disc-like (*Ceiba glaziovii* - Malvaceae), (B) flag (*Tarenaya spinosa*– Cleomaceae), (C) funnel-like (*Pilosocereus tuberculatus* - Cactaceae), (D) bilabiate (*Harpochilus neesianus* - Acanthaceae), (E) paint-brush (*Neocalyptrocalyx longifolium* - Capparaceae), and (F) brush Pseudanthium (inflorescence, *Crataeva tapia* - Capparaceae). (purple and light blue – uv reflection; C – conspicuous structures; I – Inconspicuous structures).

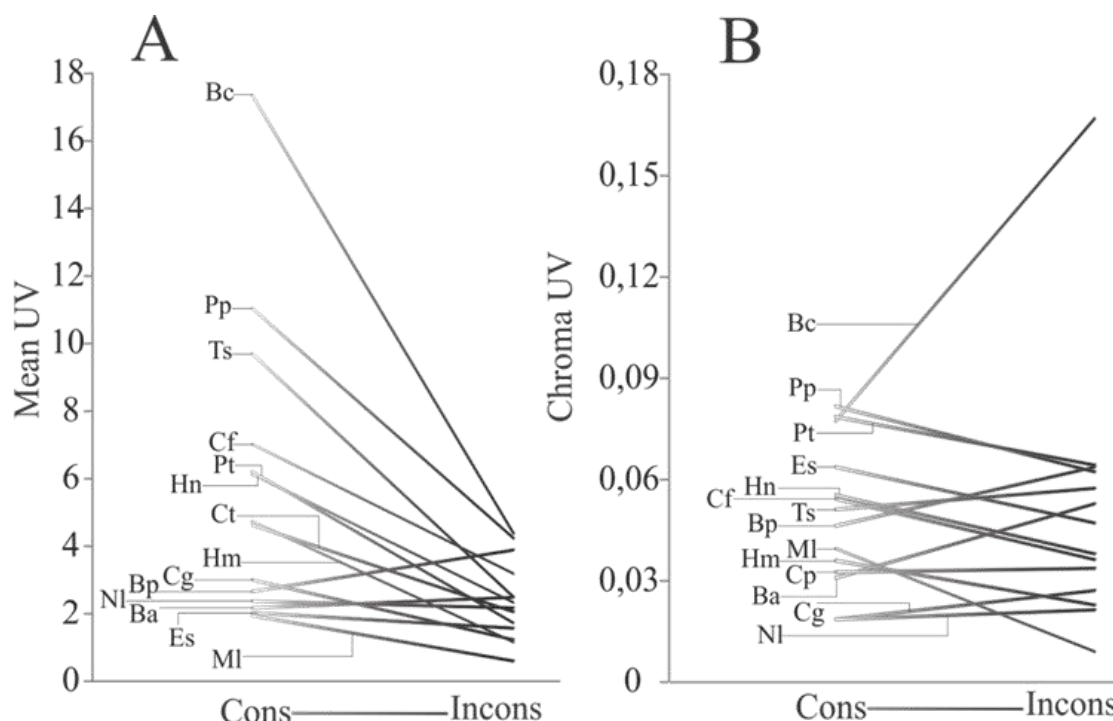


Figure 3 - Measurements obtained by the reflection curves of conspicuous (Consp) and inconspicuous (Incons) structures of bat-pollinated flowers summarized by species.

Metrics related to the structure's capacity to reflect UV light: (A) average reflectance in the band, and (B) Chroma values, an indication of how much of the total reflected color the band represents (Ba -*Bauhinia acuruana*; Bc- *B. cheilantha*; Bp – *B. pentandra* (Fabaceae); Cf-*Cynophalla flexuosa* (Capparaceae); Cg-*Ceiba glaziovii* (Malvaceae); Ct-*Crataeva tapia* (Capparaceae); Es-*Encholirium spectabile* (Bromeliaceae); Hn-*Harpochilus neesianus* (Acanthaceae); Hm-*Hymenaea martiana* (Fabaceae); MI-*Mimosa lewiisi* (Fabaceae); Nl-*Neocalyptrocalyx longifolium* (Capparaceae); Pp-*Pilosocereus pachycladus*; Pt-*P. tuberculatus* (Cactaceae); Ts-*Tarenaya spinosa* (Cleomaceae).

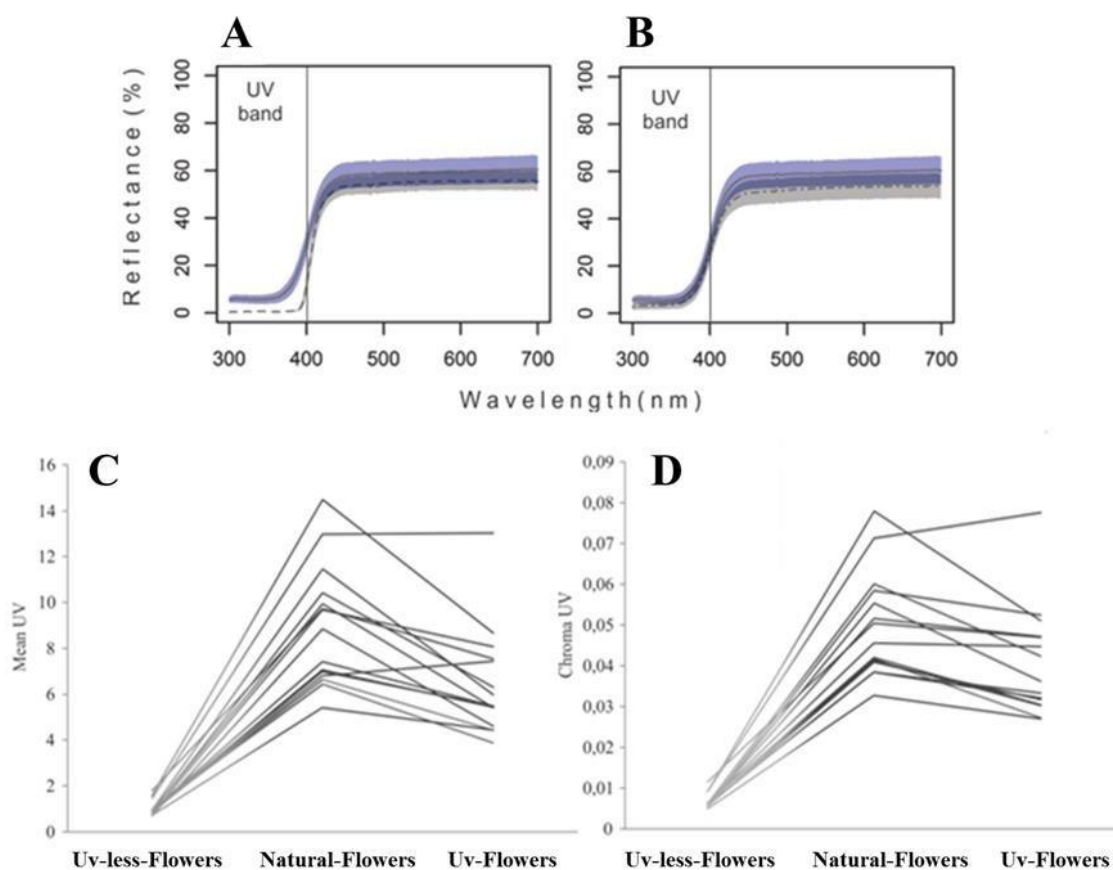


Figure 4 – Comparison among unmanipulated and manipulated petals of *Tarenaya spinosa*. (A) Reflectance curve of Natural-Flowers versus UV-Flowers and (B) Natural-Flowers versus noUV-Flowers. Measurements obtained by the reflection curves of unmanipulated and manipulated petals of *Tarenaya spinosa* paired by flowers. Metrics related to the structure's capacity to reflect UV light: (C) average reflectance in the UV-range, and (D) Chroma values at UV range, an indication of how much of the total reflected light is reflected at the UV range (Continuous line and violet area –Natural-Flowers; Dashed line and gray area – other treatments).

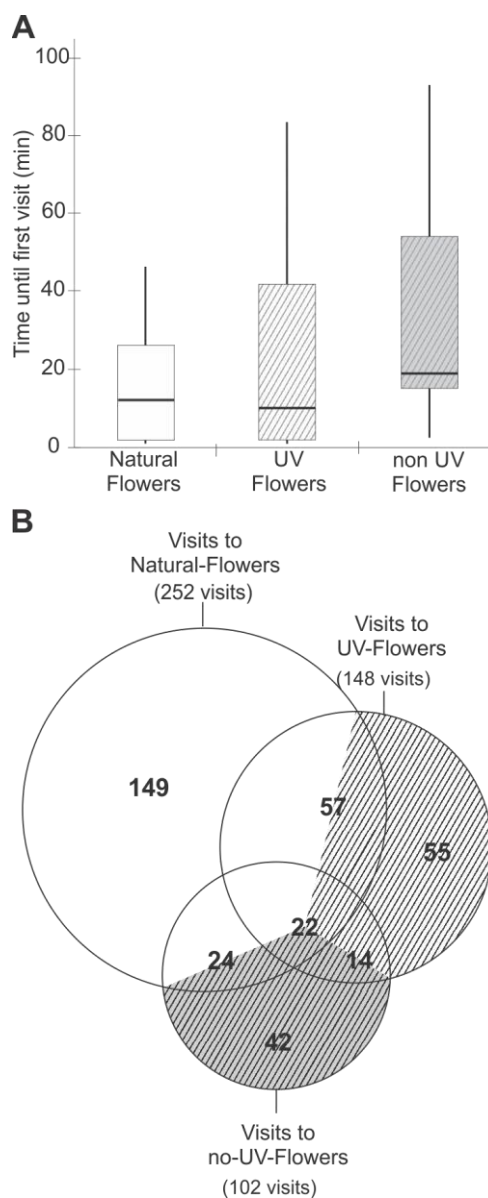


Figure 5 – Results of experiment of bat-visits to *Tarenaya spinosa* flowers manipulated with UV blocking gel. (A) Box-plot with comparison of the time of the first bat visit (Horizontal line – median; Box – quartiles; Vertical line - minimum and maximum). (B) Venn diagram with total number of approaches separated by type of visits performed (presence of gel is represented by the striped texture; presence of uv-blocking is represented by grey color; areas outside of intercession indicate approaches number with visits to only one treatment; intersections between two circles indicate approaches number with visits to both treatments; the intersection between the three circles indicate approaches number with visits to all treatments).

7 MANUSCRITO nº5: SELEÇÃO FENOTÍPICA SOBRE A MORFOLOGIA FRACTAL DE FLORES QUIROPTERÓFILAS: UM TESTE NAS FLORES CONVOLUTAS DE *HARPOCHILUS NEESSIANUS* NESS (ACANTHACEAE)

(Botanical Journal of the Linnean Society)

Arthur Domingos-Melo^{1*}, Andrea A. Cocucci², Isabel Cristina Machado¹

¹Department of Botany, Federal University of Pernambuco, Recife - PE, Brazil

³Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal, Universidad Nacional de Córdoba, CONICET, Cordoba , Argentina

*Correspondence author (arthurdom.melo@gmail.com).

ABSTRACT

Apesar do conhecimento vigente de que flores quiropterófilas utilizam reflexão acústica convergente como atrativo, muitas flores nesse sistema apresentam morfologias em fractal que podem ser associadas à difusão sonora. Frente à capacidade dos morcegos perceber estruturas complexas, é possível que esse tipo de reflexão também atue como um guia acústico. A fim de esclarecer essa questão nós tomamos *Harpochilus neessianus* como modelo, para o qual descrevemos como se dá a fractalidade das flores através do processo de abertura floral, egossemelhança e índices de fractalidade em diferentes ângulos. Nós mensuramos o valor evolutivo dessa fractalidade ao determinar sua relação com outros atributos e registrar seu processo de seleção fenotípica. Nós mostramos que a diferença na velocidade de crescimento entre pétalas e suas regiões específicas gera curvas egossemelhantes em diferentes níveis no lábio inferior das flores de *H. neessianus*. Essa fractalidade é altamente conservada ao longo da população e pode ser expressa através de uma relação perímetro/área que se mantém mesmo frente a diferentes ângulos de registro. Assim, o lábio inferior de *H. neessianus* possui um processo de abertura e morfologia únicos dentro de Acanthaceae. A seleção fenotípica mediada por polinizadores favorece pétalas mais compactas em flores menores, o que pode otimizar a difusão acústica; além de menores volumes de néctar. Nós interpretamos esses resultados à luz da história natural da espécie e apresentamos argumentos (pautados no corpo teórico da acústica geométrica e bioacústica de morcegos) sobre como a fractalidade de flores quiropterófilas pode desempenhar um importante papel de sinalização para os morcegos.

PALAVRAS CHAVE:

Bioacústica; caatinga; ecologia cognitiva da polinização; geometria acústica; morfologia floral; néctar; polinização noturna; sinalização floral

INTRODUÇÃO

Morcegos polinizadores comprovadamente utilizam a ecolocalização durante o forrageio (Simon et al., 2011; von Helversen & von Helversen, 1999). Até o momento, há duas premissas de como as flores podem explorar reflexão acústica para a atração destes animais, ambas propostas para superfícies côncavas promotoras de reflexão acústica convergente. A primeira é à amplificação do som emitido pelos morcegos, a segunda é a manutenção do som refletido frente diferentes ângulos de emissão (Helversen et al., 2003; Murphy et al., 2016). O principal argumento para a funcionalidade destes guias acústicos é a diferença entre a reflexão convergente de flores ou brácteas em contraste com a reflexão especular de botões, folhas ou estruturas reprodutivas (von Helversen & von Helversen, 1999; von Helversen & von Helversen, 2003; Simon et al., 2011). Ainda assim, sabe-se que o sentido de ecolocalização dos morcegos percebe padrões ainda mais complexos, dentre os quais está a difusão acústica e texturas de superfícies (Müller & Kuc, 2000; Ming, 2017; Jones & Teeling, 2006; Yovel et al., 2008; Simon *et al.*, 2014).

É possível encontrar grande parte das plantas polinizadas por morcegos com estruturas reprodutivas cuja a morfologia opõe-se totalmente aquelas postuladas para reflexão acústica convergente (*sensu* Helversen et al., 2003; Murphy et al., 2016). Em especial, podemos destacar o caso de flores ou inflorescências do tipo pincel ou pseudo-pincel e destacam-se pelo grande número de peças (flores, pétalas ou filetes) (Faegri & van der Pijl, 1979; Fleming et al., 2009). Há ainda espécies cuja as pétalas ou sépalas apresentam-se curvadas formando cachos ou séries de arcos (Buzato & Franco 1992; Gribel & Gibbs, 2002; Vogel *et al.*, 2004). Em ambos os casos, a morfologia dessas flores é altamente complexa e pode ser definida como fractal (definição em Halley et al., 2004).

Fractais são estruturas egosemelhantes onde uma parte reflete o todo, assim como, o todo reflete a parte (Mandelbrot, 1975; Mandelbrot, 1982). Desde sua consolidação há algumas décadas, o termo fractal tem sido levado para diferentes ciências, dentre as quais, a ecologia. Nela, este conceito é utilizado afim de entender padrões complexos que dificilmente podem ser explicados por geometria euclidiana básica. Isso ocorre, pois embora seja impossível que existam fractais verdadeiros na natureza, considerando o caráter finito de seus organismos e

estruturas, muitos deles tendem à fractalidade ao exibirem estruturas auto-similares ao longo de um todo (Frontier, 1987; Kenkel & Walker, 1996; Halley et al., 2004; Sugihara & May, 1990). Esse conceito pode ser aplicado de forma recorrente em biologia vegetal. A dendrometria das árvores, a borda de folhas, a filotaxia de inflorescências e a morfologia complexa de algumas flores são apenas alguns exemplos (Plotze et al., 2005; Chandra & Rani, 2009; Medel et al., 2014). Embora muitas estruturas em plantas tenham sido identificadas como portadoras deste padrão, a compreensão sobre o papel funcional da fractalidade em estruturas vegetais continua incipiente.

As estruturas em fractal refletem o som de forma difusa frente a irregularidade de suas superfícies (Kinsler et al., 1999; Castiñeira-Ibáñez et al., 2012; Liu et al., 2018). Nesse sentido, copas de árvores também são estruturas em fractal (Müller & Kuc, 2000; Chandra & Rani, 2009) e morcegos conseguem distingui-las através destes padrões (Ming, 2017; Jones & Teeling, 2006; Yovel et al., 2008). Desta forma, é possível assumir com segurança que certas flores são superfícies de difusão acústica. Consequentemente, seria esperado que morcegos sejam capazes de distinguir flores com alta fractalidade. Consequentemente, mesmo que flores sejam muito menores do que copas de árvores, considerando que a percepção dos morcegos identifica padrões até a faixa submilimétrica (Simon *et al.*, 2014).

De todos os órgãos de uma planta, a flor é o mais sujeito à processos determinísticos em sua morfologia frente sua complexa interação com os polinizadores (Hansen *et al.*, 2007; Pélabon *et al.*, 2011). Desta forma, entendemos que havendo uma funcionalidade para a fractalidade em flores polinizadas por morcegos é possível mensurar seu valor evolutivo mensurável (Lande & Arnold, 1983). Eventualmente, essa fractalidade poderia atuar não apenas como atributo de atração aos polinizadores, mas também como um atributo de ajuste morfológico ao corpo dos mesmos (*sensu* Faegri & van der Pijl, 1979). Desta forma, nós encontramos um modelo onde é possível analisar essas funções isoladamente: *Harpochilus neessianus* (Acanthaceae), um arbusto polinizado por morcegos que é endêmico de Caatinga e destaca-se por sua flor bilabiada com pétalas enoveladas no lábio inferior (Vogel *et al.*, 2004; Côrtes & Rapini, 2013).

Neste trabalho, nós tomamos *H. neessianus* como modelo para entender o papel da complexidade estrutural em flores quiropterófilas. Nós realizamos duas abordagens. Na primeira delas, nós descrevemos como se dá a fractalidade das flores. Para isso, analisamos o processo de abertura floral, demonstramos a egossemelhança da flor e a retratamos através de índices de fractalidade. Nós também verificamos se esses atributos se mantinham frente diferentes ângulos. Na segunda abordagem, nós propomos um valor evolutivo à essa

fractalidade ao determinar sua relação com outros atributos e quantificar como estão sujeitos à seleção fenotípica. A partir de nossos resultados e fortes evidências teóricas nós propomos como essa fractalidade está envolvida em um processo de sinalização acústica para os morcegos.

MATERIAL E MÉTODOS

Espécie modelo e população estudada

Harpochilus neesianus é um arbusto endêmico da Caatinga ocorrendo em regiões mais áridas, sobre solo geralmente pedregoso ou em afloramentos de arenito avermelhado (Côrtes & Rapini., 2013). Seu sistema de polinização foi descrito por Vogel *et al.* (2004), sendo os morcegos seus únicos polinizadores.

Devido sua morfologia floral, *H. neesianus* é um ótimo modelo para nosso estudo. Isso ocorre porque suas flores são bilabiadas, enquanto no lábio inferior três pétalas formam um novelo, no lábio superior as duas pétalas formam um tubo que sustenta as estruturas reprodutivas (Vogel *et al.*, 2004). Lábio superior e lábio inferior notavelmente cumprem papéis diferentes, funcionando respectivamente como atributos de ajuste e atratividade (*sensu* Faegri & van der Pijl, 1979). Por um lado, sabe-se que o grande comprimento do lábio superior (e consequentemente das estruturas reprodutivas) tem a função de atingir o uropatágio dos morcegos evitando a interferência polínica, sendo o único caso do tipo registrado até o momento (Domingos-Melo, em preparação). Por outro lado, a função da configuração enovelada das pétalas que formam o lábio inferior segue desconhecida. O estabelecimento desta complexa morfologia demanda uma longa abertura floral, que pode durar o dia todo, embora as flores só iniciem sua funcionalidade ao anoitecer (Vogel *et al.*, 2004). Há ainda um tubo floral onde acumula-se o néctar, cuja a secreção é continua ao longo da noite, sem reabsorção ou extravasamento, permitindo mensurar facilmente a disponibilidade de recurso (DomingosMelo, em preparação). Por fim, outra vantagem em ter *H. neesianus* como modelo é sua alogamia (Domingos-Melo, em preparação) permitindo uma forte associação de seu *fitness* à atuação dos morcegos polinizadores.

Nós conduzimos o estudo em uma área de Caatinga no Parque Nacional do Catimbau (PARNA Catimbau) (Gomes *et al.*, 2006). Esta floresta seca destaca-se por ser um dos locais no planeta com uma das maiores porções de espécies polinizadas por morcegos (Machado e Lopes, 2004). A população estudada estava dispersa por alguns quilômetros em manchas de areia entre a Serra das Torres e Serra Branca (-8°32'45"S 37°15'00"W). Nesses locais, *H. neesianus* ocorre em áreas abertas e forma grandes adensados com vários indivíduos envoltos

por Caatinga arbustiva (perenifólia, com elementos de cerrado e de campos rupestres) e Caatinga arbustivo-arbórea, (árvores e arbustos frequentemente contorcidos e com espinhos).

Determinação da fractalidade: abertura floral e egossimilaridade e ângulos de observação

A fim de determinar a fractalidade presente no lábio inferior das flores de *H. neessianus* nós acompanhamos o processo de abertura floral, descrevemos a egossimilaridade das curvas das pétalas e estimamos sua fractalidade.

Nós acompanhamos o processo da abertura da flor de *H. neesianus* e sua repercussão na morfologia. Para isso, mensuramos a velocidade de crescimento das diferentes partes da corola. Nós fizemos fotos de flores com escala ao longo de sua abertura em diferentes horários (n=20). Com essas fotos nós mensuramos o comprimento das estruturas florais em diferentes momentos através do software ImageJ. Então, nós estimamos a velocidade de crescimento destas estruturas através da fórmula $vc=(cf-ci)/t$ (adaptado de Pommerening & Muszta, 2016). Onde vc é a velocidade de crescimento, cf é o comprimento final, ci é o comprimento inicial e t é o tempo. Desta forma, nós geramos dois pares de medidas a serem comparadas: velocidades de crescimento do lábio superior vs lábio inferior (medidas tomadas das 8h às 12h); e velocidades de crescimento das margens da pétala vs centro das pétalas, ambas do lábio inferior (medidas tomadas das 12h às 15h). Estes valores foram comparados através de testes t pareados.

Para descrever a egossimilaridade do lábio inferior da flor de *H. neessianus* nós fotografamos flores e botões em diferentes fases no campo e os coletamos para análise em laboratório sob estereomicroscópio. A egossimilaridade é definida como a semelhança exata ou aproximada de um objeto em relação a uma parte de si mesmo (Mandelbrot, 1982). Desta forma, nós procuramos encontrar estruturas que se repetissem em diferentes níveis a fim de ilustrá-las.

Para verificar uma potencial manutenção na forma como o lábio inferior da flor de *H. neessianus* é percebido frente a ângulos de observação, nós comparamos suas propriedades estruturais frente em diferentes planos.

Inicialmente nós buscamos uma forma de mensurar propriedades fractais desta estrutura. Há diferentes formas de mensurar fractalidade em sistemas biológicos, estes métodos em geral consideram divisores, grids, relações perímetro-área, distribuição hiperbólica, distribuição de tamanhos, entre outros (Frontier, 1987; Kenkel & Walker, 1996; Halley et al., 2004; Sugihara & May, 1990). Considerando que em nosso sistema a principal característica a gerar essa complexidade é a quantidade de bordas presentes nas pétalas, nós optamos por uma abordagem

que considera a relação perímetro/área. Além do próprio perímetro (P) e área (A), nós optamos por utilizar duas medidas relativizando-as. A primeira delas aponta o perímetro como produto da área elevada à dimensão fractal (D), isto é $P=A^{2/D}$. Neste contexto, D descreve a complexidade do formato (Kenkel & Walker, 1996; Halley et al., 2004). A segunda medida aponta a proporção de borda (B) como uma razão simples entre perímetro e área, isto é $B=P/A$ e indica uma proporção de borda existente em relação à área do objeto (Bogaert *et al.*, 2000).

Uma vez escolhidas as variáveis estruturais a serem consideradas, nós retratamos o lábio inferior em dois planos relacionados ao eixo de simetria bilateral da flor: um ortogonal a partir da vista frontal e um paralelo a partir da vista lateral (n=35 flores/uma por indivíduo). Nós fizemos isto através de fotografias padronizadas a partir dos diferentes ângulos sobre um fundo preto com escala. Em seguida, nós utilizamos o software ImageJ para transformar estas fotos em imagens 8 bits. A partir destas imagens, mensuramos automaticamente o perímetro (medidas calculadas a partir do total de pixels determinando as margens internas e externas do espaço em branco) e área (medidas calculadas a partir do total de pixels preenchendo a área em branco). Os planos definidos ortogonal e paralelamente capturam o perímetro como resultado de duas características: as ondulações nas margens das pétalas e espaçamento entre as pétalas. Essas duas características são indicadas respectivamente pela dimensão D e proporção de borda. Por fim, todos os valores (perímetro, área, proporção de borda e dimensão D) foram confrontados entre dos diferentes ângulos através registrados, buscando-se entender se eram correlacionados ou similares.

Teste de Seleção fenotípica

Com o objetivo de verificar se há um valor evolutivo na fractalidade do lábio inferior de *H. neessianus*, nós testamos como esse atributo pode estar sujeito à seleção fenotípica mediada por polinizadores. Para isso, utilizamos a abordagem proposta por Lande e Arnold (1983), onde são testadas relações entre diferentes atributos florais e seu efeito em diferentes níveis de fitness, a partir das quais é possível fazer inferências sobre o tipo, a força e a direção da seleção fenotípica (Morrissey & Sakrejda, 2013; Siepielski et al., 2013). Considerando que a seleção atua simultaneamente sobre diferentes atributos da flor e que a fractalidade estaria desempenhando o papel de atrativo secundário frente sua reflexão acústica difusa, nós incluímos em nossa abordagem atributos de ajuste (morfometria) e do atrativo primário (néctar). Nossa amostragem consistiu em 100 indivíduos de *H. neessianus*, onde para cada um estimamos o fenótipo e o fitness.

Medidas de fenótipo e integração floral

Para amostrar a fractalidade e morfometria ao longo da população nós fizemos fotos da vista lateral em relação ao eixo de simetria em um fundo preto com escala. Dado o tipo floral bilabiado e o formato estreito da flor, nessas fotos capturamos toda a morfologia floral em um único plano. Assim, nós fotografamos três flores em cada indivíduo (n total=300). Nós fizemos as fotos entre 15h e 17h30, quando a abertura floral já estava completa.

Após confrontar os valores de perímetro, área, proporção de borda e dimensão D entre os diferentes ângulos de registro, escolhemos uma única medida que melhor expressasse a complexidade do lábio inferior da flor de *H. neesianus*. Esta medida foi mensurada assim como descrito acima, porém apenas para o plano ortogonal lateral.

Para a morfometria, nestas mesmas fotos nós mensuramos através do software ImageJ os comprimentos do tubo, do lábio superior, do estame e do pistilo, que juntos atuam no ajuste da flor ao corpo dos morcegos considerando tanto o tamanho total da flor, a distância até o recurso e o local de deposição de pólen no corpo do animal.

Para mensurar os atributos do néctar, em cada indivíduo nós ensacamos três flores em pré-antese e as mantivemos assim ao longo de toda a antese. Para garantir que nenhum néctar seria perdido devido abscisão da flor, antes de serem ensacadas, as flores tiveram suas corolas fixadas ao receptáculo com fita adesiva. Nós deixamos o néctar secretado acumular-se ao longo da noite e o coletamos nas primeiras horas da manhã seguinte mensurando seu volume com auxílio de Microseringa Hamilton para GC - Agulha Fixa - Volume 50 uL (Modelo 705N) e aferindo sua concentração de açúcares com auxílio de Refratômetros Manuais Atago Brix 0.0 á 53.0% modelo MASTER-53T.

Nós utilizamos as variáveis mensuradas (fractalidade, morfometria e néctar) para construir uma matriz de correlação a partir da qual verificamos a existência de módulos intraflorais (Baranzelli et al., 2014). Tomamos em conta que nossa amostragem permite a construção de modelos robustos para até três atributos fenotípicos. Desta forma, a partir destes módulos, nós elegemos duas variáveis (uma morfológica e uma do néctar) que não apresentassem correlação direta com o estimador de fractalidade para compor o modelo de seleção fenotípica.

Medidas de fitness

Nós mensuramos o componente feminino do fitness de cada indivíduo tanto no nível de formação de frutos, quanto na formação de sementes. Para obtenção destes valores, nós utilizamos as mesmas três flores fotografadas para morfometria, as quais marcamos deixamos expostas aos morcegos polinizadores em condições naturais durante toda a noite de antese. Nós então acompanhamos estas flores após a senescência até a eventual formação de frutos. Nós coletamos os frutos antes do início da deiscência e contamos o número de sementes formadas. Nós utilizamos a média de frutos formados por indivíduo como a primeira medida de fitness, e a média de sementes por fruto por indivíduo como a segunda medida de fitness.

Análises de seleção fenotípica

Nós então avaliamos se a seleção fenotípica estava operando atualmente sobre características florais no nível da população. Era de nosso particular interesse testar como a fractalidade do lábio inferior afeta a aptidão (componente feminino no nível de formação de frutos e sementes) de *Harpochilus neesianus*, separadamente e em conjunto com o ajuste floral e a oferta de recurso. Para isso, nós estimamos a oportunidade de seleção para ambos níveis do componente feminino do fitness (I) e os gradientes de seleção que atuam na população aplicando procedimentos padronizados (Lande e Arnold, 1983; Brodie et al., 1995). Para essas análises, padronizamos os traços florais para média zero e variância unitária e dividimos os valores individuais das medidas de fitness pela média populacional (Benitez-Vieyra & Ordano, 2014). Finalmente, visualizamos a seleção correlacional atuando em duas características que traçam superfícies de aptidão, usando os gradientes correlacionais calculados através do R software v2.15.0 com a função paramétrica correspondente do modelo de Lande & Arnold (1983) (Benitez-Vieyra & Ordano, 2014).

RESULTADOS

Determinação da Fractalidade: abertura flora, egossimilaridade e diferentes ângulos

A morfologia enovelada do lábio inferior da flor de *H. neesianus* é em parte resultante do complexo processo de abertura floral. Em alguns casos é possível visualizar o início da separação entre lábio inferior e superior já às 17h do dia anterior, o que resulta em um processo de abertura de mais de 24 horas. Nós constatamos que diferentes partes da corola crescem cada uma em uma velocidade própria promovendo a formação de diferentes curvas (Figura 1-C).

Durante essa separação, já na parte da manhã (8h às 12h) o lábio superior cresce mais rapidamente do que o inferior, com as respectivas velocidades de $5.6 \pm 0.5 \text{ mm/h}$ e $1.8 \pm 0.3 \text{ mm/h}$ ($t=19.89$; $gl=20$; $p<0.001$). Como resultado deste processo, o lábio superior configura-se em uma grande curva e suas pétalas tornam-se muito mais longas que as pétalas do lábio inferior. Durante a parte da tarde, o processo de enovelamento das pétalas do lábio inferior se intensifica. Isso se dá em parte por uma marcada diferença ($t=17.33$; $gl=20$; $P<0.0001$) na velocidade de crescimento entre o meio ($12 \pm 0.1 \text{ mm/h}$) e a borda de suas pétalas ($18.6 \pm 2.8 \text{ mm/h}$), forçando a margem das pétalas a tornarem-se revolutas (Figura 1 – C e D).

As pétalas de *H. neesianus* seguem um padrão de egossimilaridade bastante evidente, isso ocorre pois partes isoladas da pétala replicam a morfologia da pétala como um todo (Figura 1 – A). Inicialmente, o próprio botão de *H. neesianus* pode ser entendido como uma curva (Figura 1 - B). À medida que ocorre um crescimento diferencial entre as partes das pétalas do lábio inferior é possível encontrar outros diferentes níveis de curvas (Figura 1 - C e D), que conferem um aspecto enovelado para esta estrutura.

Os planos ortogonais e paralelos obtidos através das fotografias retrataram satisfatoriamente a fractalidade do lábio inferior da flor de *H. neesianus* (Figura 1 – I à L; Tabela 1). Nós registramos que os perímetros obtidos pelos diferentes ângulos são positivamente correlacionados, já as áreas obtidas da mesma forma apresentaram uma fraca correlação entre si. Em ambos os casos, os valores reportados em vista lateral foram maiores que em vista frontal. Perímetro e área também apresentaram uma variação considerável ao longo da população, com coeficientes de variação ao redor de 15 e 18%. Os diferentes estimadores de fractalidade (Dimensão D e a proporção de borda) forneceram informações distintas. Embora a dimensão D dos diferentes ângulos esteja correlacionada e apresente valores maiores para a vista lateral, este atributo apresentou uma variação ínfima ao longo da população com coeficientes de variação de menos de 3%. Já proporção de borda, embora apresente uma fraca correlação, é similar entre os diferentes ângulos e tem variação ao longo da população, em torno de 18 à 22%.

Estes resultados demonstram que o lábio inferior é mais aparente em vista lateral assemelhando-se a vista frontal principalmente pela proporção de borda. Além disso, a fractalidade no lábio inferior se mantém ao longo de toda a população, variando apenas a compactação do novelo formado por ele.

Medidas de fenotipo e integração floral

Entre os atributos que estimam a fractalidade do lábio inferior das flores de *H. neesianus*, nós escolhemos a proporção de borda. Nós escolhemos este atributo, pois ele variou notavelmente mais na população do que da dimensão D, cuja a variação foi ínfima. Além disso, apesar da baixa correlação, a proporção de borda foi o único atributo que não diferiu entre os dois planos ortogonais.

A flor de *H. neesianus* é altamente integrada (Tabela 2), havendo relação entre todos os atributos morfológicos mensurados com coeficientes de correlação ao redor de 0.54 à 0.91. Nesse contexto, apenas o comprimento do tubo não estava correlacionado a proporção de borda do lábio inferior. Volume e concentração de néctar apresentaram poucas relações com os atributos morfológicos, e não estão correlacionados entre si.

Para a construção dos modelos de seleção fenotípica, além da proporção de borda do lábio inferior, considerando a integração intrafloral, nós escolhemos o comprimento do tubo e o volume de néctar como variáveis explicativas. Nós escolhemos o tubo floral, pois apresenta uma das maiores variações fenotípicas entre os atributos morfológicos e é o único não relacionado à proporção de borda. Devido à alta integração floral, podemos entendê-lo como um indicativo do tamanho total da flor, além de ser a estrutura menos sujeita a erros de desenvolvimento, já formada desde o botão. Em relação ao néctar, nós escolhemos o volume, pois este apresentou a maior variação, contrastando com a concentração que apresentou o menor coeficiente de variação entre todos os atributos mensurados.

Medidas de fitness

O fitness de *H. neesianus* foi intermediário com formação de frutos de $34.33 \pm 31.23\%$ por indivíduo e 1 ± 1 semente por fruto formado. Desta forma, nós encontramos valores altos para oportunidade de seleção tanto na formação de frutos ($I=0.83$), quanto na formação de sementes ($I=1.14$). Estas duas medidas de fitness estavam altamente correlacionadas em toda a população ($r=0.87$; $gl=98$; $p<0.0001$).

Análises de seleção fenotípica

No nível de formação de frutos não encontramos efeito de seleção fenotípica em quaisquer dos atributos considerados, tanto nas estimativas univariadas, quanto nas multivariadas (Tabelas 3 e 4). Por outro lado, no nível de formação de sementes encontramos ação da seleção fenotípica sobre os atributos, tanto ao serem considerados de forma univariada como multivariada. Analisando cada atributo individualmente, encontramos seleção direcional

negativa para comprimento do tubo e volume de néctar, bem como seleção estabilizadora apenas para o volume (Tabela 3). Ao considerar estes atributos de forma multivariada (Tabela 4), encontramos seleção direcional negativa também para proporção de borda (Figura 2 - A) e as seleções direcionais negativas para tubo e volume são mantidas (Figura 2 - B e C). Nós registramos efeito da interação do comprimento da proporção de borda com o comprimento do tubo, havendo intervalos ótimos de fitness nos valores extremos desta interação, em especial nos valores mais baixos (Figura 2 - D). Há também efeito da interação entre o comprimento do tubo e o volume de néctar formando um gradiente com maior fitness nos valores mais baixos dessa interação (Figura 2 - E).

Estes resultados indicam que os indivíduos que mais obtém sucesso na formação de sementes são aqueles com: menores proporções de borda e consequentemente lábios inferiores mais compactos (ex: comparação entre flores da Figura 1 - I x K) ; tubos florais menores e consequentemente com flores menores como um todo (ex: comparação entre lábios inferiores da Figura 1 - E x G); e flores que secretem néctar em menor quantidade. Esse sucesso é diminuído no caso de flores que ao mesmo tempo tenham valores de fractalidade e tamanho intermediários e intensificado no caso de flores que ao mesmo tempo sejam menores e com menos néctar.

DISCUSSÃO

Neste trabalho nós mostramos que a diferença na velocidade de crescimento entre pétalas e suas regiões específicas gera curvas egossemelhantes em diferentes níveis no lábio inferior das flores de *H. neessianus*. Essa fractalidade é altamente conservada ao longo da população e pode ser expressa através de uma relação perímetro/área que se mantém mesmo frente a diferentes ângulos de registro. A seleção fenotípica mediada por polinizadores na população estudada favorece lábios inferiores mais compactos em flores menores, com menos néctar. A seguir, ponderamos esses resultados à luz da história evolutiva e natural da espécie. Em especial, nós apresentamos argumentos pautados no corpo teórico da acústica geométrica e bioacústica de morcegos sobre como a fractalidade de flores quiropterófilas pode desempenhar um importante papel de sinalização para os morcegos.

Um notável lábio inferior

Frente ao padrão de crescimento observado, nós sugerimos que a morfologia singular do lábio inferior deve-se a uma incomum intensificação de divisões celulares anticlinais nas bordas de pétalas (Kinet, 2018). Parte dessa condição pode ser explicada por *H. neesianus* estar incluso em Justicieae. Nesse grupo a ontogenia da corola evoluiu para a estivação coclear ascendente, permitindo prevalência de flores bilabiadas com marcada diferença entre lábios (Scotland et al., 1994; Westerkamp & Claben-Bockhoff 2007; Kiel et al, 2018). Em *H. neesianus*, esse processo ocorre de forma exacerbada forçando o enovelamento das pétalas. Desta forma, registramos uma abertura única, até então nunca registrado em Acanthaceae. De fato, os padrões de abertura floral para a família envolvem geralmente aberturas simples em espiral (Scotland et al., 1994; Schönenberger & Endress, 1998; Moylan 2004; Hirão, 2015).

A partir desta abertura é gerada uma morfologia que desafia conceitos importantes. Embora flores bilabiadas sejam conceitualmente zigomorfas (Citerne et al., 2010; Westerkamp & Claben-Bockhoff 2007), o novelo formado pelo lábio inferior de *H. neessianus* não apresenta necessariamente simetria bilateral. Além disso, lábios inferiores de flores bilabiadas por serem adaptações para o pouso de abelhas são reduzidos em flores polinizadas por vertebrados (Westerkamp & Claben-Bockhoff 2007). Essa situação não ocorre em *H. neesianus*, que distingue-se das espécies mais próximas polinizadas por abelhas por ter lábios inferiores enovelados, mas que não que sofrem a redução registrada em espécies próximas que são polinizadas por beija-flores (Côrtes & Rapini., 2013; Kiel et al, 2018).

Até o momento, nas poucas vezes em que a fractalidade foi medida como um atributo floral, foi utilizada distribuição hiperbólica (Herrera, 1993; Medel et al., 2014), o que considera o avanço progressivo das lacunas a partir do centro de um objeto (Mandelbrot, 1982). Foram descritas apenas flores actinomorfas em disco, especialmente o efeito do número de peças florais e espaçamento entre elas (Medel et al., 2014). Já *H. neesianus*, apresenta um padrão ainda mais complexo, pois trata-se de uma estrutura amorfa, descontínua e tridimensional onde não é possível observar um padrão hiperbólico.

A fixação e manutenção de um atributo tão singular, sugere uma importante funcionalidade. O uso da reflexão acústica parece ser particularmente importante nas Acanthaceae polinizadas por morcegos (Ramamoorthy 1991; Rosales, 1997; Vogel, 2005; Tripp & Manos, 2008; Muchhala & Thomson 2010), pois elas em geral atendem os requisitos para a reflexão acústica convergente, com tubos largos e côncavos (Heltersen et al., 2003; Murphy et al., 2016). Neste sentido, é razoável que haja um papel de guia acústico para o lábio inferior de

Harpochilus neesianus na sinalização acústica para morcegos polinizadores, porém através de um mecanismo diferente, a difusão sonora.

Evidências da fractalidade como sinal acústico

Compreender a difusão sonora proposta para a complexidade do lábio inferior de *H. neesianus* passa por dois passos importantes. O primeiro deles é descrever tal complexidade, o que alcançamos através de análises de fractalidade. O segundo é entender como as características descritas através desta fractalidade podem ser interpretadas como pistas acústicas.

Embora não tenhamos mensurado a difusão acústica das flores de *H. neesianus*, conceitos simples de geometria acústica subsidiam essa funcionalidade. É um conceito claro e bem suportado que superfícies irregulares complexas refletem o som de forma difusa. A difusão sonora ocorre quando o chocar-se com uma dada superfície irregular, o som é refletido em diferentes ângulos forçando parte das ondas de compressão a se anularem (Medeiros, 2002). Esse conceito é tão assertivo que é utilizado recorrentemente em projetos de engenharia, arquitetura, sistemas de som e outras (Egan, 2007; Möser, 2009). Algumas destas aplicações práticas envolvem a aplicação de estruturas em fractais (Kinsler et al., 1999; Castiñeira-Ibáñez et al., 2012; Liu et al., 2018).

Se por um lado estruturas fractais são comprovadamente promotoras de difusão sonora, por outro a reflexão acústica de folhas patentes é comprovadamente especular (Simon et al., 2011). Como as características do lábio inferior se mantêm iguais ou correlacionadas entre os planos frontal e lateral, isso sugere que a forma como o som é refletido deve ser muito semelhante nos diferentes ângulos. Essas são condições muito importantes, considerando que é o contraste com as folhas que permite que morcegos possam identificar pistas acústicas das flores durante o voo (Simon et al., 2011). Como *H. neesianus* ocorre em áreas abertas de Caatinga (Côrtes & Rapini., 2013) suas flores permanecem expostas aos polinizadores e não escondidas sob a folhagem, o que propicia o uso de pistas acústicas (Muchhala & Serrano, 2015).

A baixa variação na dimensão D, em contraste com os demais atributos mensurados no lábio inferior, também atende um outro importante requisito da sinalização acústica. Nos morcegos, o córtex cerebral processa formato independentemente do tamanho. Em termos práticos, ao utilizar a ecolocalização, caso um padrão sonoro se mantenha entre diferentes objetos, os mesmos serão interpretados da mesma maneira independentemente de seu volume

(Simon et al, 2006; Firzlaff & Schuller, 2007). Desta forma, a fractalidade gera uma assinatura sonora particular que pode funcionar como sinal para os morcegos ao se manter constante em toda a população independentemente do tamanho das flores. Adicionalmente, a própria histologia das pétalas pode auxiliar nessa sinalização, dada a capacidade dos morcegos de perceber texturas (Simon, 2014).

Atribuindo um valor evolutivo

Frente os argumentos que consolidam o papel da fractalidade como atributo de sinalização, é preciso mensurar seu efeito na população ao atribuir-lhe um valor evolutivo. A baixa variação pode ser interpretada como uma primeira pista da existência de uma funcionalidade na dimensão D do lábio inferior. Isso ocorre, pois o conservantismo de um atributo floral geralmente está associado a um papel importante na polinização, indicando intensa seleção no passado (Anderson, 1979; Pélabon et al, 2004). Embora não fosse possível testar a fractalidade propriamente dita, nós conseguimos verificar o efeito de um importante atributo a ela associado, a proporção de borda. Nós mostramos que flores com menos proporção de borda (menos lacunas e menor espaçamento) tem um incremento no fitness, gerando seleção fenotípica direcional negativa. Nesse contexto, nossos resultados são muito assertivos, pois se o lábio inferior tem um papel de difusão acústica, é importante evitar espaços em sua estrutura que deixem o som passar. Esse processo atua em conjunto com a seleção direcional negativa sobre outros dois atributos: o tamanho da flor e o volume de néctar.

O efeito do tamanho da flor pode ser explicado pela deposição de pólen de *H. neessianus* ocorrer na extremidade final do corpo dos morcegos, o uropatágio. Suas longas estruturas reprodutivas tem baixa acurácia e eventualmente excedem o tamanho do animal (DomingosMelo, dados não publicados). Assim, ter flores menores pode aumentar a chance de uma deposição de pólen efetiva. O tamanho floral é um atributo sob uma demanda conflitante, pois, em geral, pode influenciar tanto no ajuste quanto na atração de polinizadores (Arista & Ortiz 2007; Kaczorowski et al., 2012). De fato, alguns animais selecionam flores muito mais pelo tamanho do que pelo formato da corola (Kaczorowski et al., 2012). No caso da reflexão acústica, o tamanho pode evoluir independentemente, pois os morcegos conseguem perceber apenas o formato dos objetos (Simon et al, 2006; Firzlaff & Schuller, 2007). Ainda assim, há um efeito da interação entre tamanho da flor e quantidade de borda, o que acreditamos estar associado à influência do tamanho da flor sobre a exposição do novelo.

Em relação ao néctar, menores volumes podem forçar os morcegos à intensificar o contato com a flor para alcançar o recurso, o que pode ser intensificado pelo efeito negativo de remoção de néctar presente na espécie (Domingos-Melo, dados não publicados). A interação do tamanho da flor com o volume demonstra que esse processo se mantém mesmo e flores com tubos pequenos. Até o momento, esse tipo de limitação ao acesso do néctar em flores polinizadas por morcegos tem sido associado ao comprimento do tubo (Muchhala & Thomson, 2009). Em contrapartida, é importante considerar que em flores tubulares o ajuste ao aparato bucal do polinizador é muito mais determinado pelo nível alcançado pelo néctar dentro do tubo do que por sua extensão (Moré et al., 2012). A reflexão acústica difusa pode, em parte, propiciar esse mecanismo, pois morcegos podem detectar os volumes de néctar em flores por ecolocalização (Toelch & Winter, 2007). Consequentemente, flores com difusão acústica poderiam camuflar o néctar evitando que morcegos sejam dissuadidos a visitar flores com volumes menores.

Fractalidade em outras flores polinizadas por morcegos

A mesma fractalidade das flores de *H. neesianus* pode estar presente de outras formas em flores polinizadas por morcegos. Como exemplo, podemos citar os tipos florais pseudopinceis (*sensu* Faegri & van der Pijl, 1979) de grupos com registro de quiropterofilia como Pitcairnioideae, Mimosoideae e Agavaceae (Slaouson, 2000; Vogel, 2005; Cruz-Neto, 2008; Queiroz et al., 2016). Isso ocorre porque nestes grupos várias inflorescências saem de um mesmo ponto do escape floral ou ramo, de cada uma delas partem várias flores de onde partem vários longos estames (Grimes, 1999; Mogensen 1969; Barros et al, 2017) o que gera uma alta egossimilaridade. Além disso a própria morfologia recortada de flores isoladas também podem garantir alguma fractalidade. De fato, esse é um padrão recorrentemente nas angiospermas (Endress & Matthews 2006). Abordagens nesse sentido envolvendo testes com polinizadores até então só tem sido associadas a corolas (Herrera 1993a; Herrera 1993b; Kaczorowski et al., 2012; Medel et al, 2014), mas outros verticilos podem gerar um grande incremento na complexidade floral. Um exemplo é o caso das Bombacoideae ou Caryocaraceae cuja intensa expansão dos filetes na ontogenia das flores somada ao grande número de peças do androceu lhes permite adquirir um aspecto em pincel (*sensu* Faegri & van der Pijl, 1979; van Heel, 1966; Gribel & Hay, 1993). Para muitas dessas flores, podemos esperar os mesmos padrões apontados de difusão acústica nas flores de *H. neesianus*. Afinal a morfologia em pincel de flores ou inflorescências parecem variar muito pouco dentro de uma espécie, bem como são percebidas

de forma muito semelhante a partir de diferentes ângulos. Mesmo flores em disco podem possuir estruturas que aumentem sua complexidade. Este é o caso da corona com várias pétalas, sépalas e raios de corona (verticilo estéril que se origina a partir da corola) em Passifloraceae, família também com diferentes registros de polinização por morcegos (Buzato & Franco 1992; Prenner, 2014).

Até o momento, a evolução da morfologia de flores na mudança para a quiropterofilia tem sido estudada sob uma perspectiva de ajuste ao corpo dos morcegos (Tripp & Manos, 2008; Joly et al., 2016; Lagomarsino *et al.*, 2017). Coincidentemente, os grupos que serviram de modelo para estes estudos tem flores tubulares nos quais a morfologia em campânula é favorecida na polinização especializada por estes animais. Como este formato atende fortemente as demandas esperadas para a reflexão acústica convergente (Helversen et al., 2003; Murphy et al., 2016), é possível associar parte da evolução da corola de flores quiropterófilas ao desenvolvimento pistas sonoras. Um processo análogo poderia estar atuando em flores polinizadas por morcegos com alta complexidade estrutural e fractalidade. Essa condição seria possível, pois estruturas florais elaboradas podem ser altamente homoplásticas e aparecer e desaparecer várias vezes ao longo de uma linhagem (Endress & Matthews, 2006; Boer *et al.*, 2012). No caso de flores em pincel ou pseudo-pincel, que em um primeiro momento funcionam como ajuste otimizando a deposição de pólen (Faegri & van der Pijl, 1979), sua morfologia poderia simultaneamente atuar promovendo difusão acústica.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao PELD-Catimbau (CNPq 459485 / 2014-8) e à FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco) que apoiaram esta pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anderson WR. 1979. Floral conservatism in neotropical *Malpighiaceae*. *Biotropica*, 219-223.

Arista M, Ortiz PL. 2007. Differential gender selection on floral size: an experimental approach using *Cistus salvifolius*. *Journal of Ecology*, 95(5), 973-982.

Baranzelli MC, Sérsic AN, Cocucci AA. 2014. The search for Pleiades in trait constellations: functional integration and phenotypic selection in the complex flowers of *Morrenia brachystephana* (A pocynaceae). *Journal of evolutionary biology*, 27(4), 724-736.

Bogaert J, Rousseau R, Van Hecke P, Impens I. 2000. Alternative area-perimeter ratios for measurement of 2D shape compactness of habitats. *Applied Mathematics and Computation*, 111(1), 71-85.

Buzato S, Franco AL. 1992. *Tetrastylis ovalis*: a second case of bat-pollinated passionflower (Passifloraceae). *Plant Systematics and Evolution*, 181(3-4), 261-267.

Camarero JJ, Sisó S, Gil-Pelegrín E. 2002. Fractal dimension does not adequately describe the complexity of leaf margin in seedlings of *Quercus* species. In *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, 60(1), 63-71.

Castiñeira-Ibáñez S, Rubio C, Romero-García V, Sánchez-Pérez JV, García-Raffi LM. 2012. Design, manufacture and characterization of an acoustic barrier made of multiphenomena cylindrical scatterers arranged in a fractal-based geometry. *Archives of Acoustics*, 37(4), 455-462.

Chandra M, Rani M. 2009. Categorization of fractal plants. *Chaos, Solitons & Fractals*, 41(3), 1442-1447.

Citerne H, Jabbour F, Nadot S, Damerval C. 2010. The evolution of floral symmetry. In: *Advances in botanical research*, Academic Press, 54: 85-137.

Côrtes ALA, Rapini A. 2013. *Justicieae* (Acanthaceae) of the Semiarid of Bahia State, Brazil. *Hoehnea*, 40(2), 253-292.

Dalayap RM, Torres MAJ., Demayo CG. 2011. Landmark and outline methods in describing petal, sepal and labellum shapes of the flower of *Mokara* orchid varieties. *Int. J. Agric. Biol*, 13, 652-658.

De Barros TC, Pedersoli GD, Teixeira SP. 2017. Anther glands in *Mimosoideae* (Leguminosae) are emergences with a conserved meristematic origin. *Flora*, 226: 1-9.

De Boer HJ, Schaefer H, Thulin M, Renner SS. 2012. Evolution and loss of longfringed petals: a case study using a dated phylogeny of the snake gourds, *Trichosanthes* (Cucurbitaceae). *BMC evolutionary biology*, 12(1), 108.

Egan MD. 2007. *Architectural Acoustics (J. Ross Publishing Classics)*, 4: 49. J. Ross Publishing.

Endress, PK, Matthews ML. 2006. Elaborate petals and staminodes in eudicots: diversity, function, and evolution. *Organisms Diversity & Evolution*, 6(4), 257-293.

Faegri, K, Pijl L van der. 1979. *The principles of pollination ecology*.

Fleming TH, Geiselman C, Kress WJ. 2009. The evolution of bat pollination: a phylogenetic perspective. *Annals of botany*, 104(6), 1017-1043.

Frontier S. 1987. Applications of fractal theory to ecology. In: *Develoments in Numerical Ecology*, Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 335-378.

Gomes APDS, Rodal MJN, Melo ALD. 2006. Florística e fitogeografia da vegetação arbustiva subcaducifólia da Chapada de São José, Buíque, PE, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*.

Gomez JM, Bosch J, Perfectti F, Fernández JD, Abdelaziz, M, Camacho JPM. 2008. Spatial variation in selection on corolla shape in a generalist plant is promoted by the preference patterns of its local pollinators. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 275(1648), 2241-2249.

Gribel R, Gibbs PE. 2002. High outbreeding as a consequence of selfed ovule mortality and single vector bat pollination in the Amazonian tree *Pseudobombax munguba* (Bombacaceae). *International Journal of Plant Sciences*, 163(6), 1035-1043.

Gribel R, Hay JD. 1993. Pollination ecology of *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae) in Central Brazil cerrado vegetation. *Journal of tropical ecology*, 9(2), 199-211.

Grimes J. 1999. Inflorescence morphology, heterochrony, and phytogeny in the mimosoid tribes ingeae and acacieae (Leguminosae: Mimosoideae). *The Botanical Review*, 65(4), 317-347.

Halley JM, Hartley S, Kallimanis AS, Kunin WE, Lennon JJ, Sgardelis SP. 2004. Uses and abuses of fractal methodology in ecology. *Ecology Letters*, 7(3), 254-271.

Hansen TF, Pélabon C, Armbruster WS. 2007. Comparing variational properties of homologous floral and vegetative characters in *Dalechampia scandens*: testing the Berg hypothesis. *Evolutionary Biology*, 34(1-2), 86-98.

Helversen DV, Holderied MW, Helversen OV. 2003. Echoes of bat-pollinated bellshaped flowers: conspicuous for nectar-feeding bats?. *Journal of experimental biology*, 206(6), 1025-1034.

Herrera CM. 1993. Selection on complexity of corolla outline ina hawkmothpollinated violet.. *Evolutionary Trends in Plants*, 7:1.

Herrera, C.M. 1993a. Selection on complexity of corolla outline in a hawk-mothpollinated violet. *Evolutionary Trends in Plants*, 7: 9–13.

Herrera CM. 1993b. Selection on floral morphology and environmental determinants of fecundity in a hawkmoth-pollinated violet. *Ecological Monographs*, 63:251–275.

Hirao YV. 2015. *Morphological and ontogenetic studies with inflorescences and flowers of Lepidagathis Willd.(Acanthaceae)* (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).

Joly S, Lambert FC, Alexandre H, Clark JL. 2016. Pollinator specialization imposes stronger evolutionary constraints on flower shape. *bioRxiv*, 041533.

Jones G, Teeling EC. 2006. The evolution of echolocation in bats. *Trends in Ecology & Evolution*, 21(3), 149-156.

Kaczorowski RL, Seliger AR, Gaskett AC, Wigsten SK, Raguso RA. 2012. Corolla shape vs. size in flower choice by a nocturnal hawkmoth pollinator. *Functional Ecology*, 26(3), 577-587.

Kenkel NC, Walker DJ. 1996. Fractals in the biological sciences. *Coenoses*, 77-100.

Kiel CA. 2016. *Unraveling relationships among the morphologically diverse and taxonomically complex 'justicioid' lineage (Acanthaceae) and the evolution of androecial form in New World Justicia*. Tese de Doutorado da Claremont Graduate University.

Kiel CA, Daniel TF, McDade LA. 2018. Phylogenetics of New World 'justicioids' (Justicieae: Acanthaceae): Major Lineages, Morphological Patterns, and Widespread Incongruence with Classification. *Systematic Botany*, 43(2), 459-484.

Kinet JM. 2018. *The Physiology of Flowering: Volume III: The Development of Flowers*. CRC press.

Kinsler LE, Frey AR, Coppens AB, Sanders JV. 1999. Fundamentals of acoustics. *Fundamentals of Acoustics*, 4th Edition, by Lawrence E. Kinsler, Austin R. Frey, Alan B. Coppens, James V. Sanders, pp. 560. ISBN 0-471-84789-5. Wiley-VCH.

Lagomarsino LP, Forrestel EJ, Muchhala, N, Davis CC. 2017. Repeated evolution of vertebrate pollination syndromes in a recently diverged Andean plant clade. *Evolution*, 71(8), 1970-1985.

Lande R, Arnold SJ. 1983. The measurement of selection on correlated characters. *Evolution*, 37(6), 1210-1226.

Liu J, Li L, Xia B, Man X. 2018. Fractal labyrinthine acoustic metamaterial in planar lattices. *International Journal of Solids and Structures*, 132, 20-30.

Machado IC, Lopes AV. 2004. Floral traits and pollination systems in the Caatinga, a Brazilian tropical dry forest. *Annals of Botany*, 94(3), 365-376.

Mandelbrot B B. 1975. Stochastic models for the Earth's relief, the shape and the fractal dimension of the coastlines, and the number-area rule for islands. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72(10), 3825-3828.

Mandelbrot BB. 1982. *The fractal geometry of nature* (Vol. 1). New York: WH freeman.

Medeiros EB. 2002. Introdução a teoria acústica. *Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais [Internet].* [acesso 16 jul 2010]. Disponível em: <http://www.cpdee.ufmg.br/~semea/anais/artigos/EduardoBauzer.pdf>.

Medel R, González-Browne C, Botto-Mahan C. 2014. Flower complexity and fractals. *Frontiers in Ecology, Evolution and Complexity*, 31.

Ming C. 2017. *Foliage Echoes and Sensing in Natural Environments* (Doctoral dissertation, Virginia Tech).

Mitchell TC, Dötterl S, Schaefer H. 2015. Hawk-moth pollination and elaborate petals in Cucurbitaceae: the case of the Caribbean endemic *Linnaeosicyos amara*. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 216, 50-56.

Mogensen HL. 1969. Floral ontogeny and an interpretation of the inferior ovary in *Agave parryi*. *Canadian Journal of Botany*, 47(1), 23-26.

More M, Amorim FW, Benitez-Vieyra S, Medina A M., Sazima M, Cocucci AA. 2012. Armament imbalances: match and mismatch in plant-pollinator traits of highly specialized long-spurred orchids. *PLoS One*, 7(7), e41878.

Morrissey MB, Sakrejda K. 2013. Unification of regression-based methods for the analysis of natural selection. *Evolution*, 67(7), 2094-2100.

Möser M. 2009. *Engineering acoustics: an introduction to noise control*. Springer Science & Business Media.

Moylan EC, Rudall PJ, Scotl R.W. 2004. Comparative floral anatomy of *Strobilanthinae* (Acanthaceae), with particular reference to internal partitioning of the flower. *Plant Systematics and Evolution*, 249(1-2), 77-98.

Muchhala N, Serrano D. 2015. The complexity of background clutter affects nectar bat use of flower odor and shape cues. *PloS one*, 10(10), e0136657.

Muchhala N, Thomson JD. 2009. Going to great lengths: selection for long corolla tubes in an extremely specialized bat–flower mutualism. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, rspb-2009.

Muchhala N, Thomson JD. 2010. Fur versus feathers: pollen delivery by bats and hummingbirds and consequences for pollen production. *The American Naturalist*, 175(6), 717-726.

Müller R, Kuc R. 2000. Foliage echoes: a probe into the ecological acoustics of bat echolocation. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 108(2), 836-845.

Murphy M, Clare E L, Rydell J, Yovel Y, Bar-On Y, Oelbaum P, Fenton MB. 2016. Opportunistic use of banana flower bracts by *Glossophaga soricina*. *Acta*

Chiropterologica, 18(1), 209-213.

Neto OC. 2008. Ecologia da Polinização de *Inga striata* (Benth.)(LeguminosaeMimosoideae) em um remanescente de Mata Atlântica em Alagoas-AL. *Revista Brasileira de Biociências*, 5(S1), 570-572.

Pélabon C, Armbruster WS, Hansen TF. 2011. Experimental evidence for the Berg hypothesis: vegetative traits are more sensitive than pollination traits to environmental variation. *Functional Ecology*, 25(1), 247-257.

Pélabon C, Carlson ML, Hansen TF, Yoccoz NG, Armbruster WS. 2004. Consequences of inter-population crosses on developmental stability and canalization of floral traits in *Dalechampia scandens* (Euphorbiaceae). *Journal of evolutionary biology*, 17(1), 19-32.

Plotze RDO, Falvo M, Pádua JG, Bernacci LC, Vieira MLC, Oliveira GCX, Bruno OM. 2005. Leaf shape analysis using the multiscale Minkowski fractal dimension, a new morphometric method: a study with *Passiflora* (Passifloraceae). *Canadian Journal of Botany*, 83(3), 287-301.

Pommerening A, Muszta A. 2016. Relative plant growth revisited: Towards a mathematical standardisation of separate approaches. *Ecological modelling*, 320:383-392.

Prenner G. 2014. Floral ontogeny in *Passiflora lobata* (Malpighiales, Passifloraceae) reveals a rare pattern in petal formation and provides new evidence for interpretation of the tendril and corona. *Plant systematics and evolution*, 300(6), 1285-1297.

Queiroz JA, Quirino ZGM, Lopes AV, Machado IC. 2016. Vertebrate mixed pollination system in *Encholirium spectabile*: a bromeliad pollinated by bats, opossum and hummingbirds in a tropical dry forest. *Journal of Arid Environments*, 125:21-30.

Ramamoorthy TP. 1991. *Ruellia* section *Chiropterophila* (Acanthaceae): a novelty from Mexico. *Botanical journal of the Linnean Society*, 107(1), 79-88.

Rosales M. 1997. *Trichanthera gigantea* (Humboldt. Et Bonpland.) Nees, a review. In: *Livestock feed resources and integrated farming systems. II FAO electronic conference on tropical feeds. Roma.*

Schönenberger J, Endress PK. 1998. Structure and development of the flowers in *Mendoncia*, *Pseudocalyx*, and *Thunbergia* (Acanthaceae) and their systematic implications. *International Journal of Plant Sciences*, 159(3), 446-465.

Scotland RW, Endress PK, Lawrence TJ. 1994. Corolla ontogeny and aestivation in the Acanthaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 114(1), 49-65.

Siepielski AM, Gotanda KM, Morrissey MB, Diamond SE, DiBattista JD, Carlson SM. 2013. The spatial patterns of directional phenotypic selection. *Ecology letters*, 16(11), 1382-1392.

Simon R, Holderied MW, Koch CU, von Helversen O. 2011. Floral acoustics: conspicuous echoes of a dish-shaped leaf attract bat pollinators. *Science*, 333(6042), 631-633.

Simon R, Knörnschild M, Tschapka M, Schneider A, Passauer N, von Helversen O. 2014. Biosonar resolving power: echo-acoustic perception of surface structures in the submillimeter range. *Frontiers in physiology*, 5:64.

Sugihara G, May RM. 1990. Applications of fractals in ecology. *Trends in Ecology & Evolution*, 5(3), 79-86.

Toelch U, Winter Y. 2007. Psychometric function for nectar volume perception of a flower-visiting bat. *Journal of Comparative Physiology A*, 193(2), 265-269.

Tripp E A, Manos PS. 2008. Is floral specialization an evolutionary dead-end? Pollination system transitions in *Ruellia* (Acanthaceae). *Evolution: International Journal of Organic Evolution*, 62(7), 1712-1737.

Van Heel WA. 1966. Morphology of the androecium in Malvales. *Blumea-Biodiversity, Evolution and Biogeography of Plants*, 13(2), 177-394.

Vogel SP. 1954. *Blütenbiologische Typen als Elemente der Sippengliederung, dargestellt anhand der flora Suedafrikas*. Fischer (Gustav).

Vogel S, Machado IC, Lopes AV. 2004. Harpochilus neesianus and other novel cases of chiropterophily in neotropical Acanthaceae. *Taxon*, 53(1), 55-60.

Von Helversen D, Von Helversen O. 1999. Acoustic guide in bat-pollinated flower. *Nature*, 398(6730), 759.

Von Helversen D, Von Helversen O. 2003. Object recognition by echolocation: a nectar-feeding bat exploiting the flowers of a rain forest vine. *Journal of Comparative Physiology A*, 189(5), 327-336.

Westerkamp C, Claßen-Bockhoff R. 2007. Bilabiate flowers: the ultimate response to bees?. *Annals of Botany*, 100(2), 361-374.

Yovel Y, Franz MO, Stilz P, Schnitzler HU. 2008. Plant classification from bat-like echolocation signals. *PLoS computational biology*, 4(3), e1000032.

TABELAS

Tabela 1 – Fractalidade de lábio inferior das flores de *Harpochilus neesianus* (Acanthaceae) analisada frente a diferentes ângulos. (Md=média; Dp=desvio padrão; Cv= Coeficiente de variação; Cp=Coeficiente de correlação de Pearson; t= teste t pareado)

	Plano ortogonal frontal	Plano ortogonal lateral	Cp	T
	Md ± Dp (Cv)	Md ± Dp (Cv)		
Perímetro (cm)	19.36±3.67(18.96)	23.14±4.36(18.84)	0.68***	6.82***
Área (cm ²)	2.50±0.40(16.00)	2.71±0.42(15.50)	0.16	2.31*
Dimensão D	1.49±0.04(2.68)	1.51±0.03(1.99)	0.34*	3.13**
Proporção de borda (cm/cm ²)	7.90±1.75(22.15)	8.61±1.53(17.77)	0.15	1.97

*p<0.05; **p<0,001; ***p<0.0001

Tabela 2 – Integração fenotípica intrafloral de *Harpochilus neesianus* (Acanthaceae) (Md=média; Dp=desvio padrão; Cv= Coeficiente de variação).

			Md ± Dp (Cv)	Coeficiente de correlação de Pearson					
				PB	TB	LS	ES	PT	VL
Fractalidade									
	PB	7.63±1.01(13.22)							
(cm/cm²)									
Tubo (cm)	TB	1.85=0.19(11.52)	-0.16						
Lábio superior (cm)	LS	7.87=0.83(10.50)	-0.29*	0.54***					
Estame (cm)	ES	8.06=s0.84(10.42)	-0.31*	0.52***	0.91***				
Pistilo (cm)	PT	8.97=0.96(11.68)	-0.33**	0.46***	0.84***	0.85***			
Volume (µl)	VL	113.77=37.23(33.72)	-0.13	0.03	0.18	0.14	0.21*		
Concentração (%)	CN	25.09=1.63(6.49)	0.13	-	-0.26*	-0.16	-0.18	-0.03	
				0.28*					
*p<0.05; **p<0,001; ***p<0.0001									

*p<0.05; **p<0,001; ***p<0.0001

Tabela 3 – Seleção fenotípica univariada sobre três características florais através da função feminina em *Harpochilus neesianus* no Parque Nacional do Catimbau – Brasil.

		Frutos		Sementes	
Linear		s	sd	s	sd
	Proporção de borda do lábio inferior	-0.09	0.14	-0.18	0.17
	Comprimento do tubo	-0.19	0.11	-0.27	0.14**
	Volume de néctar	-0.13	0.09	-0.25	0.11***
Quadrático		c	sd	c	sd
	Proporção de borda do lábio inferior	-0.15	0.25	-0.01	0.31
	Comprimento do tubo	-0.17	0.17	-0.02	0.21
	Volume de néctar	0.13	0.12	0.20	0.15*

*p<0.05; **p<0,001; ***p<0.0001

Tabela 4 – Seleção fenotípica multivariada sobre três características florais através da função feminina em *Harpochilus neesianus* no Parque Nacional do Catimbau – Brasil.

		Frutos		Sementes	
Linear		b	sd	b	sd
	Proporção de borda do lábio inferior	-0.13	0.14	-0.247	0.174*
	Comprimento do tubo	-0.14	0.12	-0.236	0.149*
	Volume de néctar	-0.14	0.09	-0.257	0.111***
Quadrático		c	sd	c	sd
	Proporção de borda do lábio inferior	-0.17	0.27	0.156	0.337
	Comprimento do tubo	0.008	0.18	0.146	0.224
	Volume de néctar	0.15	0.12	0.21	0.15
Interação	Proporção de borda x	0.246	0.24	0.43	0.296*
	Comprimento do tubo	-0.16			
	Proporção de borda x Volume de néctar		0.15	-0.12	0.189
	Comprimento do tubo x	0.284	0.14	0.301	0.168*
	Volume de néctar				

*p<0.05; **p<0,001; ***p<0.0001

FIGURAS

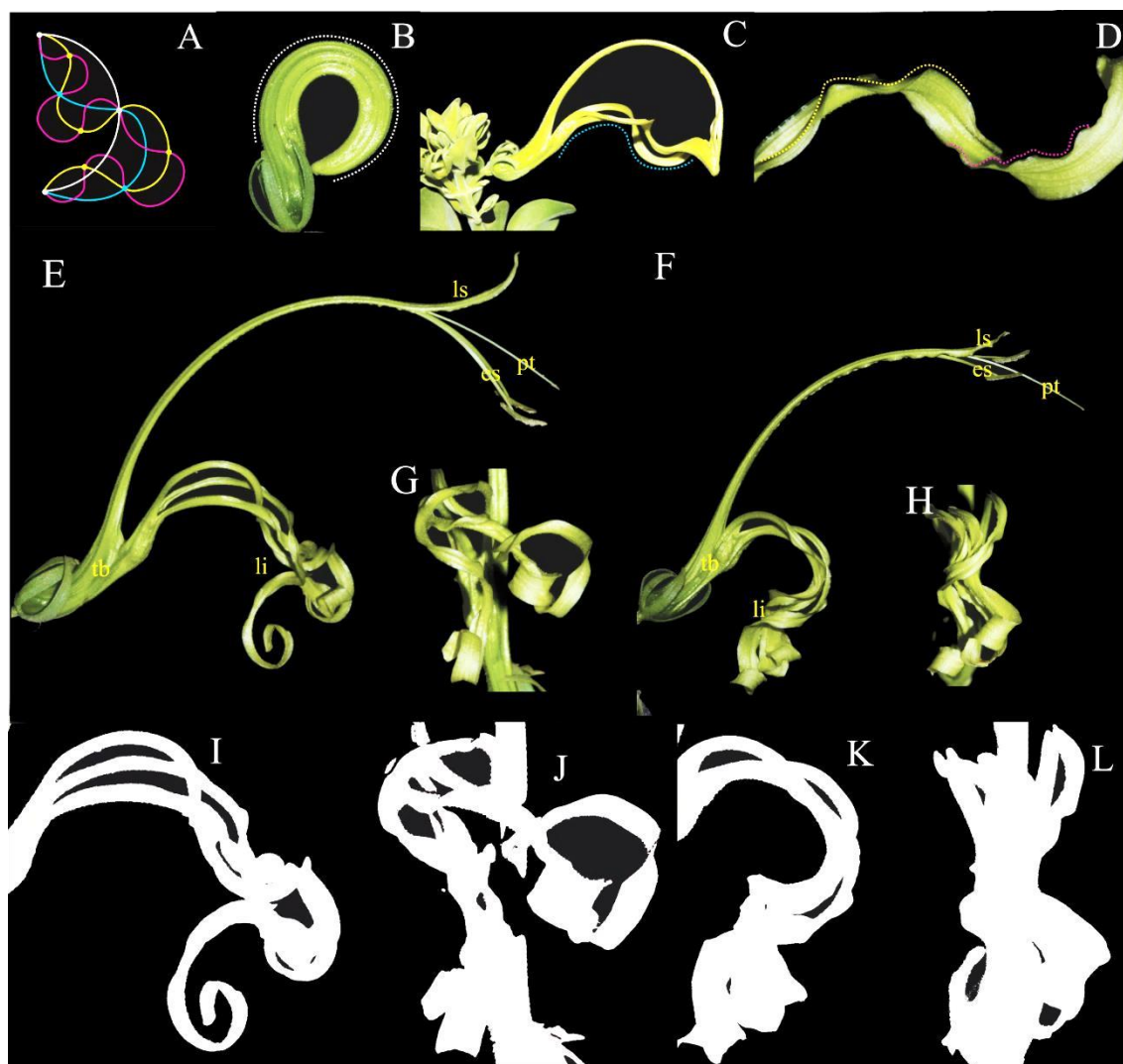


Figura 1 - Variação da morfologia floral e fractalidade das curvas do lábio inferior da flor de *Harpochilus neessianus* (Acnathaceae) na população do PARNA Catimbau, Brasil. A – Representação da egossimilaridade das curvas. B – Botão em pré-antese. C – Processo de abertura floral. D – Pétala após a completa distensão. E e F – Vista lateral da flor. G e H – respectivas vistas frontais dos lábios inferiores. I, J, K e L – Estrutura retratada a partir dos planos ortogonal e lateral de simetria utilizados na obtenção da relação perímetro/área. (Linhas branca, azul, amarela e rosa representam respectivamente primeiro, segundo, terceiro e quarto níveis de curvas; tb -tubo floral; li – lábio inferior; ls – lábio superior; pt – pistilo; es – estame).

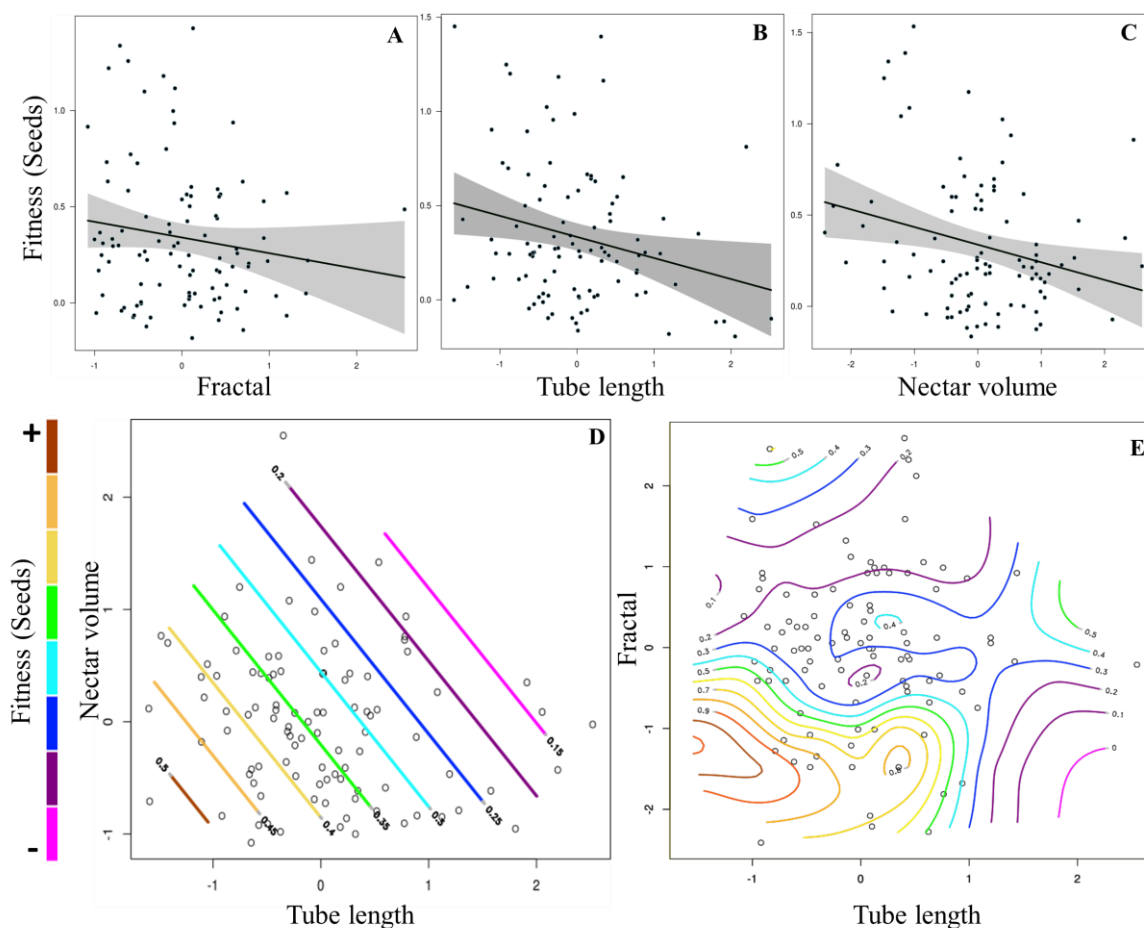


Figura 2 – Seleção fenotípica de *Harpochilus neessianus* (Acnathaceae) na população do PARNA Catimbau, Brasil retratada a partir da aptidão relativa do componente feminino do fitness (conjunto de sementes). Função linear de três traços de flor: A – fractalidade (proporção de borda), B - comprimento do tubo e C - volume do néctar. Superfície de seleção para o sucesso relativo feminino na função de duas características: D - volume do néctar e comprimento do tubo e E - comprimento do tubo e fractalidade (linhas coloridas indicam diferentes níveis de valores de aptidão e pontos indicam indivíduos na população). Os valores das medidas de aptidão são padronizados para a média populacional e os valores das características são padronizados a partir da subtração pela média e divisão pelo desvio padrão.

8 MANUSCRITO nº6: MORFOLOGIA FLORAL EXTREMA TRANSFERE PÓLEN COM EXCLUSIVIDADE E PRECISÃO NO UROPATÁGIO DE MORCEGOS

(A ser enviado para a revista *Journal of Plant Ecology*)

Arthur Domingos-Melo^{1*}, Andrea A. Cocucci², Isabel Cristina Machado¹

¹Department of Botany, Federal University of Pernambuco, Recife - PE, Brazil

³Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal, Universidad Nacional de Córdoba, CONICET, Cordoba , Argentina

ABSTRACT

A forma de flores é determinada por causas multifatoriais, dentre elas a fuga da interferência polínica e auto-deposição de pólen. Contudo, morfologias florais alongadas são, em primeira análise, associadas à processos coevolutivos de “corrida armamentista”. Aqui nós mostramos um caso que foge à esta regra: as incrivelmente longas estruturas reprodutivas de *Harpochilus neesianus* que são ajustadas para transferir pólen com exclusividade e precisão sobre o uropatágio do morcego polinizador generalista *Glossophaga soricina*. Isso é demonstrado pela correspondência entre distâncias operacionais da flor e o corpo do morcego, sua alta acurácia reprodutiva e a manutenção da hercogamia. Como resultado, em *H. neesianus* não há qualquer deposição de pólen interespecífico e pouco de pólen endógeno, permitindo a espécie uma xenogamia bem-sucedida apesar de ser autocompatível e exposta à intensa partilha de polinizadores com outras espécies quiropterófilas de Caatinga. Até onde nós sabemos, este é o primeiro caso de uma especialização para deposição de pólen no uropatágio de morcegos, essa dramática e arriscada adaptação demonstra como outros processos além do encaixe ao corpo dos polinizadores podem ser determinantes.

PALAVRAS-CHAVE

Acurácia reprodutiva; Caatinga; hercogamia; interferência polínica; morfologia floral; polinização por morcegos;

INTRODUÇÃO

Dentre os diversos atributos florais, podemos destacar a morfologia de flores como produto de uma complexa interação entre diferentes pressões de seleção natural. Além do papel na composição do display floral (Herrera 1992; Mitchell *et al.* 2004), flores que melhor ajustam-se aos corpos de seus principais polinizadores aumentam as chances de obter maiores sucessos reprodutivos (Nilsson 1988; Fenster and Martén-Rodríguez 2007). As flores também precisam conciliar a morfologia entre seus próprios verticilos, em especial os reprodutivos, a fim de permitir que partes masculinas e femininas toquem as mesmas partes do corpo do polinizador (Armbruster *et al.* 2009b; Armbruster *et al.* 2009a). Adicionalmente, algumas flores tem morfologias capazes de prevenir a deposição de pólen endógeno sobre o estigma, ou promovela como segurança reprodutiva por autogamia (Webb and Lloyd 1986; Domingos-Melo *et al.* 2018). Por fim, processos de interferência polínica acentuam a competição por espaço no corpo do polinizador, promovendo a diferenciação floral (Grant 1994; Pauw 2006a; Armbruster 2014).

Morfologias florais com alongamentos extremos são um tema atrativo em biologia da polinização. Além da emblemática orquídea de Darwin (Arditti *et al.* 2012), há vários registros notáveis envolvendo flores que surpreendem ao ajustar-se à morfologias extremas de seus polinizadores (ex: línguas de morcegos - Muchhala 2006; bicos de beija-flores - Lindberg and Olesen 2001; probóscides de moscas ou abelhas - Borrell 2005; Johnson and Steiner 1997; pernas de abelhas coletoras de óleo - Machado *et al.* 2002; Vogel and Michener 1985; ovopositores de vespas - Eisikowitch and Ghara 2017; Rodriguez *et al.* 2017). Apesar de teorias alternativas que propõem a fuga de predadores e adaptação unilateral por parte das plantas (Wasserthal 1997), a maior parte destes casos é entendido como resultados de coevolução do tipo “corrida armamentista”. Nele, estruturas florais tentam sobrepujar partes excepcionalmente longas do corpo dos polinizadores (Moré *et al.* 2012). Assim, elas garantem o contato às estruturas reprodutivas e intensificam a força com que ocorre (Nilsson 1988; Muchhala and Thomson 2009). Este processo também podem ser associado à algum nível de especialização, pois flores que restringem o acesso de seus recursos à poucos polinizadores, podem obter fidelidade ou preferência dos mesmos (Fenster and Martén-Rodríguez 2007; Huang *et al.* 2015).

Contudo, tem sido comprovado que relações planta-polinizador são preponderantemente assimétricas, com plantas ou polinizadores especialistas interagindo respectivamente com polinizadores e plantas generalistas (Bascompte *et al.* 2003; Stang *et al.*

2007). Este é o caso das flores polinizadas por morcego que são xenógamas e altamente dependentes de seus polinizadores (Gribel and Gibbs 2002; Ratto et al. 2018). e parecem ter uma forte especialização funcional, embora mantenham-se como generalistas ecológicas (*sensu* Ollerton et al. 2007). Como consequência, além de lidar com o ajuste mecânico, precisão e deposição de pólen endógeno, a maioria das espécies polinizadas por morcego está particularmente sujeita ao efeito da interferência polínica (Howell 1977; Muchhala and Thomson 2012). Essas condições podem gerar processos de seleção intensos considerando que morcegos são polinizadores altamente eficientes e promotores de intensas respostas adaptativas nas plantas com as quais interage (Sahley et al. 1993; Tripp and Manos 2008).

Considerando a grande superfície do corpo dos morcegos e sua capacidade de transportar muito pólen, é possível às plantas explorar diferentes estratégias de deposição de pólen (Helvesen and Reyer 1984; Muchhala and Thomson 2010a; Fleming et al. 2009; Aguiar et al. 2014). Nesse contexto, e se fosse possível que uma morfologia extrema se desenvolvesse como uma forma de explorar de forma exclusiva um morcego polinizador generalista? Esta última condição parece adequar-se ao dramático caso descrito por Vogel et al. (2005b): a flor de *Harpochilus neesianus* Ness (Acanthaceae) cuja as longas estruturas reprodutivas depositem pólen no uropatágio do morcego *Glossophaga soricina*, Pallas 1766 (Phyllostomidae) um dos morcegos polinizadores mais generalistas já registrados (Lemke 1984, 1985; Sánchez-Casas and Alvarez 2000; Arias et al. 2009; Carter et al. 2010).

Neste trabalho nós descrevemos em detalhes como funciona a arriscada estratégia de deposição de pólen no uropatágio dos morcegos em *Harpochilus neesianus*. Para tanto, nós confrontamos as distâncias de estruturas reprodutivas com a morfometria do corpo dos morcegos e mensuramos a precisão do sistema através de índices de inacurácia adaptativa (Armbruster et al. 2009a). Em seguida, nós testamos a eficiência do sistema quantificando a deposição de pólen interespecífico, co-específico e endógeno sobre o estigma e testando o sistema reprodutivo através de experimentos de polinização controlada. Nós discutimos nossos resultados a partir de quatro diferentes questões norteadoras: o ajuste ao corpo dos polinizadores; a precisão do sistema; a prevenção de deposição de pólen endógeno; e a fuga da interferência polínica.

MATERIAL DE MÉTODOS

População estudada

Harpochilus neesianus é um arbusto endêmico de Caatinga que ocorre em regiões mais áridas, sobre solo geralmente pedregoso ou em afloramentos de arenito avermelhado (Côrtes and Rapini 2013). Para o presente estudo, nós utilizamos uma população presente em uma área de Caatinga (-8°32'45"S 37°15'00"W), no Parque Nacional do Catimbau (PARNA Catimbau), Nordeste do Brasil (Gomes et al. 2006). A população estava dispersa ao longo de aproximadamente 5km com *H. neesianus* em áreas abertas formando grandes adensados com vários de indivíduos. Estes adensados eram cercados por Caatinga arbustiva (perenifólia, com elementos de cerrado e de campos rupestres) e Caatinga arbustivo-arbórea, (árvores e arbustos frequentemente contorcidos e com espinhos).

Morfometria funcional e inacurácia

Com o objetivo de determinar o comportamento de visita do morcego *Glossophaga soricina* nas flores de *Harpochilus neesianus* nós fizemos observações, fotos e filmagens em campo. A partir destas informações e das descrições de Vogel *et al.* (2005b) definimos as medidas a serem levadas em conta tanto na morfometria de flores, quanto de animais.

A fim de retratar a morfometria funcional de *H. neesianus*, nós fizemos fotos com escala das flores em vista lateral em relação ao eixo de simetria. Este plano nos permitiu capturar a disposição das estruturas reprodutivas em relação à entrada do tubo floral. Assim, nós fotografamos 300 flores distribuídas ao longo de 100 indivíduos na população. A partir destas imagens nós mensuramos três distâncias operacionais relacionadas à interação das estruturas reprodutivas com o corpo dos morcegos: distância do centro da antera até a entrada do tubo floral; distância do estigma até a entrada do tubo floral; e hercogamia, distância mínima entre anteras e estigma. Nós tomamos essas medidas com auxílio do software ImageJ (Abràmoff, et al. 2004).

Para confrontar os dados da morfometria floral com o morcego polinizador *Glossophaga soricina* nós realizamos a morfometria corporal destes animais. Para tanto, nós utilizamos 15 indivíduos conservados via úmida na Coleção de Mamíferos da UFPE (Astúa and Guerra 2008). Os espécimes foram coletados em três locais de Caatinga que formam um triângulo cujo centroide coincide com PARNA Catimbau (os municípios de Saloá, Brejo da Madre de Deus e Serra Talhada que distam respectivamente cerca de 50, 100 e 140 km da população estudada). Com o auxílio de um paquímetro digital, nós mensuramos as distâncias entre a boca e diferentes

partes do corpo: centro da cabeça, escápulas, inserção do uropatágio e porção final do uropatágio.

A partir dessas medidas, nós confrontamos as distâncias de estruturas reprodutivas da flor com a morfometria do corpo dos morcegos através de análises de variância e mensuramos a precisão do sistema através de índices de inacurácia adaptativa com base em Armbruster et al. (2009a; 2009b). Segundo estes autores, a inacurácia adaptativa estima a ausência de precisão em um determinado sistema, considerando as médias e variâncias de um fenótipo de interesse em uma população, permitindo verificar o quanto o fenótipo de interesse varia a partir de um ótimo esperado. Nesse sentido, a acuraria adaptativa (i) pode ser calculada como: $i = (M_f - M_o)^2 + V_o + V_f$, onde M_f é a média do fenótipo em questão, M_o é a média do ótimo determinado, V_o é a variância desse ótimo e V_f é a variância do fenótipo. Para fins comparativos, é importante também considerar os coeficientes de variação (desvio padrão/média) tanto do fenótipo de interesse, quanto do ótimo e escalonar os valores de inacurácia obtidos dividindo-os pelo quadrado da média do fenótipo analisado (i/M_f^2). Por fim, para entender como estão integradas as dimensões tomadas para as estruturas reprodutivas nós utilizamos de Pearson.

Nós consideramos como nossos primeiros fenótipos de interesse as distâncias de anteras e estigmas da entrada do tubo floral. Dado que a localização ideal da colocação de pólen em um polinizador deve estar relacionada à localização esperada do contato do polinizador com estigmas de outras flores coespecíficas (Armbruster et al. 2009a), entendemos que nossos fenótipos de interesse são ótimos recíprocos um do outro.

Nosso segundo fenótipo de interesse foi a hercogamia. Para evitar a autopolinização, é importante que exista uma distância ou afastamento entre anteras e estigmas na mesma flor (Webb and Lloyd 1986). Por outro lado, essa distância não pode ser excessiva, pois pode afetar a acuraria reprodutiva da população (Armbruster et al. 2009a). Assim, sendo o uropatágio o local esperado para deposição de pólen, o valor ótimo para a hercogamia pode ser assumido como o comprimento do próprio uropatágio. Desta forma, por mais distantes que estigmas e anteras estejam em uma mesma flor poderia ser mantida o contato com a mesma estrutura morfológica dos morcegos polinizadores. Adicionalmente, nós correlacionamos a hercogamia real, mensurada diretamente nas fotos a partir das distâncias mínimas entre anteras e estigmas, com a hercogamia esperada para modelos ideais. Esta última é descrita pelo valor modular da subtração da distância de estigmas pela de anteras (Opedal et al. 2017).

Deposição de grãos de pólen e experimentos de polinização controlada

Para fins comparativos, nós estimamos a quantidade de grãos de pólen, óvulos e a razão pólen/óvulo a partir de botões (n=24). Para tanto, utilizamos a câmara de Neubauer (Maêda 1985) e contagem direta de óvulos sob estereomicroscópio. Para determinar a quantidade de pólen depositada sobre o estigma nós realizamos três tratamentos: i) deposição de pólen endógeno (n=30) - flores não manipuladas permaneceram ensacadas impedindo o acesso dos morcegos polinizadores durante toda antese; ii) deposição de pólen exógeno intra e interespecífico (n=30) - flores foram emasculadas e expostas aos polinizadores durante toda antese; iii) deposição de pólen total (n=227) - flores não foram manipuladas e expostas aos polinizadores ao longo da antese. Essas flores foram coletadas e acondicionadas em caixas de acrílico com ágar afim de manter a turgidez de seus pistilos e no laboratório analisadas quanto ao conteúdo polínico de seus estigmas.

Nós realizamos os seguintes experimentos de polinização controlada para determinar o sistema reprodutivo de *Harpochilus neesianus*: i) agamospermia (n=30) – flores ensacadas e emasculadas; ii) auto polinização espontânea (n=30) – flores ensacadas e não manipuladas; iii) autopolinização manual (n=30) – flores ensacadas e polinizadas a partir do pólen da própria flor; iv) polinização cruzada (n=30) – flores ensacadas e polinizadas a partir de pólen de outros indivíduos; v) formação natural de frutos (n=360) - flores marcadas em campo e deixadas livremente expostas aos polinizadores.

RESULTADOS

Morfometria funcional e inacurácia

A flor de *Harpochilus neesianus* é zigomorfa, bilabiada e do tipo goela. O pequeno tubo floral possui uma dilatação ligada ao lábio inferior composto por três pétalas enoveladas. As longas estruturas reprodutivas de *H. neesianus* partem de dentro do tubo floral e são sustentadas por uma coluna formada pelas duas pétalas do lábio superior a partir das quais tornam-se pendentes, mantendo uma distância entre anteras e estigmas (Figura 1 – A e B). O comprimento total de estames (9.92 ± 1.16 cm) e pistilos (10.82 ± 1.30 cm) chega a ser seis vezes maior que o comprimento do tubo floral (1.85 ± 0.24 cm). Essas características fazem com que pistilos e estames formem uma parábola a partir da entrada do tubo floral gerando distâncias operacionais lineares de para anteras e estames (Tabela 1; Figura 2 – A). As diferentes flexibilidades e comprimentos fazem com que estiletos e filetes formem curvas distintas, que geralmente

garantem uma distância entre anteras e estigmas ($1.06 \pm 0.52 \text{ cm}$). Durante visita os morcegos aproximam-se frontalmente das flores tocando inicialmente anteras e posteriormente estigmas com a parte posterior do corpo. Então encaixam o focinho na porção dilatada do tubo para acessar o néctar e permanecem abaixo da parábola formada pelas estruturas reprodutivas enquanto pairam (Figura 1 - A).

Em geral, as distâncias operacionais das estruturas reprodutivas são maiores que o comprimento do morcego até a inserção do uropatágio ($5.50 \pm 0.23 \text{ cm}$) e menores que o comprimento até o final dele ($6.80 \pm 0.32 \text{ cm}$) (Figura 2 - B). Com diferenças significativas tanto para anteras quanto para estigmas (respectivamente: $H = 103.62$; $gl = 4$; $p > 0.0001$ / $H = 98.83$; $gl = 4$; $p > 0.0001$; todas as comparações a posteriori $p < 0.05$). Assim, sobre o uropatágio ocorre 70% da sobreposição entre as distâncias operacionais de estruturas reprodutivas (Figura 2 - C). A hercogamia foi menor do que o comprimento do uropatágio (1.29 ± 0.19), possibilitando que ambas estruturas reprodutivas contatem essa membrana, mesmo que afastados ($H = 5.68$; $gl = 1$; $p = 0.017$). Neste sentido, confirmamos o uropatágio como local preferencial de deposição de pólen e toque do estigma.

As estruturas reprodutivas são correlacionadas dentro da população e apresentaram baixos coeficientes de variação e baixos valores de inacurácia (Tabela 1). As distâncias operacionais da antera e do estigma contribuíram de forma muito semelhante para a imprecisão, embora a variação do estigma tenha sido um pouco maior. A hercogamia apresentou um alto coeficiente de variação, ao contrário do uropatágio (Tabela 1; Figura 2 - D). Após o escalonamento nota-se um alto valor de inacurácia para a hercogamia. A hercogamia calculada como esperado para uma morfologia floral simples ($0.61 \pm 0.40 \text{ cm}$) é cerca da metade da hercogamia registrada diretamente nas flores de *H. neesianus*. Além disso, apesar de significativa, a correlação entre elas é muito fraca ($r = 0.16$; $r^2 = 0.0255$; $t = 2.7842$; $gl = 296$; $p = 0.0062$).

Deposição de grãos de pólen e experimentos de polinização controlada

Harpochilus neesianus possui duas anteras que expõe o pólen para baixo (Figura 1 - C), o total de grãos de pólen por flor é de 84896 ± 13372 , considerando o número fixo de quatro óvulos por flor, estima-se uma razão pólen/óvulo de 21223 ± 7400 . A deposição de pólen endógeno foi menor que a deposição de pólen nos dois tratamentos envolvendo pólen exógeno. A quantidade de grãos de pólen sobre os estigmas polinizados não diferiu entre os tratamentos e em nenhum dos estigmas de flores expostas aos polinizadores em campo encontramos grãos

de pólen de outras espécies (Tabela 2; Figura 1 – D). *H. neesianus* tem alta eficiência reprodutiva, não forma frutos por agamospermia e é autocompatível, apesar de formar poucos frutos por autogamia. Em relação ao número de sementes, autopolinização manual e polinização cruzada superam a formação de sementes por autopolinização espontânea e natural.

DISCUSSÃO

Nossos resultados mostram o quanto as flores de *Harpochilus neesianus* são particularmente ajustadas para explorar com exclusividade o uropatágio do morcego polinizador *Glossophaga soricina* como local de transferência de pólen. Isso foi demonstrado pela distância operacional de estruturas reprodutivas que coincidem exatamente como o intervalo entre as distâncias de início e fim do uropatágio. Sua hercogamia é menor do que o esperado em relação ao uropatágio e parece ser gerada por um mecanismo mais complexo do que a simples diferença entre as distâncias operacionais de anteras e estigmas. A alta precisão desse sistema é garantida por valores baixos de inacurácia na relação antera-estigma, apesar da alta inacurácia na relação hercogamia-uropatágio. Como resultado, em *H. neesianus* não há qualquer deposição de pólen interespecífico e pouco pólen endógeno, permitindo a espécie uma xenogamia bem-sucedida apesar de ser autocompatível. A seguir, discutimos os pontos que tornam o caso de *H. neesianu* um sistema notável no contexto da manutenção da hercogamia e interferência polínica.

Encaixe ao corpo do polinizador

O caso de *Harpochilus neesianus* foge às explicações comumente associadas às morfologias florais extremas. Dado seu curto tubo floral, a espécie não parece estar associada a um processo de coevolução associado à restrição do acesso ao recurso ou à intensificação da força de contato (Borrell 2005; Johnson and Steiner 1997; Muchhala and Thomson 2009; Moré et al. 2012) Como resultado, nesse sistema não há qualquer demanda de ajuste por parte dos morcegos polinizadores.

A vantagem deste tipo de assimetria na adaptação de flores e polinizadores pode ser explicada pelas diferenças na biologia do desenvolvimento entre eles. As plantas são organismos modulares com menos restrições no desenvolvimento e sujeitas à maior plasticidade fenotípica intensificando processos de seleção natural (Specht and Howarth 2015; Specht and Howarth 2015). Já os animais são organismos unitários, enfrentando fortes restrições

alogâmicas em seu desenvolvimento, a exemplo de como grandes partes bucais podem comprometer a capacidade de voo (Kunte 2007; Dassow and Munro 1999).

A delicada morfologia floral de *H. neesianus* restringe seus morcegos polinizadores àqueles nectarívoros aptos a pairar, e não parece haver restrições funcionais que impeçam outros morcegos Glossophaginae ou Lonchophyllinae de visitar as flores ou mesmo polinizalas (Fleming and Muchhala 2008). Apesar disso, o único polinizador registrado até o momento para a espécie é *Glossophaga soricina* (Vogel *et al.*, 2004; este trabalho). Apesar da marcada variação de tamanho de *Glossophaga soricina* entre as fitofisionomias brasileiras, ele varia pouco dentro da Caatinga (Louzada and Pessôa 2013), o que nos leva a esperar que esse ajuste se mantenha nas diferentes populações de *H. neesianus*. Adicionalmente, mesmo que outros morcegos cheguem à polinizar a espécie (Muchhala and Thomson 2012) discutem que processos relacionados à deposição de pólen parecem ser muito mais explicados pelas diferenças entre flores do que entre espécies de morcegos.

Glossophaga soricina é um morcego altamente generalista, reportado em diversos estudos de polinização em todo o neotrópico (Lemke 1984, 1985; Sánchez-Casas and Alvarez 2000; Arias *et al.* 2009; Carter *et al.* 2010), inclusive na Caatinga (Machado and Vogel 2004; Vogel *et al.* 2005a; Rocha *et al.* 2007; Queiroz *et al.* 2015, 2016). Dentre as vantagens de se especializar em um polinizador generalista está a capacidade destes em se manter constantes no ambiente frente alterações ambientais. Eles fazem isso ao utilizar diferentes recursos e conseguindo permanecer grande parte do ano no ambiente, amortecendo efeitos de mudanças ambientais e desacoplamentos fenológicos (Memmott *et al.* 2007; Bascompte *et al.* 2003; Ashworth *et al.* 2004; Stang *et al.* 2007). Essa condição pode ser determinante para espécies de Caatinga, considerando que esta floresta seca é marcada por fortes oscilações climáticas e enfrenta fortes processos de distúrbio antrópico crônico nos últimos séculos (Araújo and Albuquerque 2007; Ribeiro *et al.* 2015; Rito *et al.* 2017).

Precisão do sistema

Armbruster *et al.* (2009a), propõe que diferentes morfologias florais geram diferentes forma de acesso dos polinizadores ao recurso, o que demanda diferentes níveis de acuraria reprodutiva. *Harpochilus neesianus* parece se tratar de uma combinação de dois modelos por ele postulados: posição fixa e plataforma fixa. Enquanto a primeira está relacionada ao movimento do polinizador que desliza pelas estruturas reprodutivas ao acessar o recurso na flor, demandando uma grande área de deposição de pólen no dorso do animal, (e.g. Bignoniaceae

flowers bee pollinated - (Milet-Pinheiro et al. 2009; Milet-Pinheiro and Schlindwein 2009); a segunda pressupõe que o polinizador permaneça parado durante a visita e é associada à uma área pontual de deposição de pólen (e.g. Caatinga oil flowers - (Machado et al. 2002; Bezerra et al. 2009; Carneiro et al. 2015). Em contrapartida, nossos resultados mostram que a relação entre as estruturas reprodutivas de *H. neesianus* é bastante precisa, inclusive superando valores reportados até então para ambos modelos florais e compensado o efeito negativo da hercogamia para a acurácia (Armbruster et al. 2009a, b).

Uma característica particular da polinização por morcegos parece justificar tamanha precisão: os morcegos são os polinizadores a realizar as visitas mais rápidas, podendo durar uma fração de segundo (Vogel et al. 2005b; Tschapka et al. 2015). Essa condição pode reduzir a imprecisão gerada pela movimentação do polinizador, permitindo a evolução de uma alta acurácia. De fato, os sistemas de polinização mais precisos ocorrem quando o pólen é colocado no polinizador em poucos milissegundos, quando o polinizador não tem tempo de sair da posição "correta" (Armbruster et al. 2009a).

Também é importante considerar que as distâncias operacionais de estigmas e anteras de *H. neesianus* são tão grandes que pequenas variações se tornam irrelevantes em termos proporcionais (expressa por uma maior inacurácia bruta muito maior do que padronizada). Isso pode ter uma função crucial dado o alto risco de depositar pólen no uropatágio. Sendo o uropatágio a porção terminal do corpo dos morcegos, estruturas reprodutivas maiores correm o risco de estender-se além da membrana. Esse tipo de desencontro tem se mostrado uma forte pressão evolutiva para a morfologia floral (Nattero et al. 2010; Strak and Starzomski, 2014).

Tamanha acurácia é refletida na relação quantidade de pólen, área do estigma e tamanho do polinizador (Cruden 1977; Cruden and Miller-Ward 1981). Os morcegos estão entre os maiores polinizadores (Fleming and Muchhala 2008; Fleming et al. 2009), sendo os estigmas que polinizam desproporcionalmente pequenos. A efetividade de um sistema depende da relação da área do estigma com a área de deposição de pólen no corpo do polinizador, repercutindo diretamente sobre a quantidade de pólen que uma espécie produz (Cruden and Miller-Ward 1981). Embora a razão pólen/óvulo de *H. neesianus* reflita sua condição de xenoógama obrigatória (Cruden 1977) e supere valores encontrados em algumas outras Acanthaceae com outros sistemas de polinização (Erbar and Langlotz 2005; Nadia et al. 2013); sua quantidade de pólen é menor em comparação com outras flores polinizadas por morcegos (Muchhala and Thomson 2010b) confirmando a precisão do sistema.

Manutenção da hercogamia

A hercogamia presente em *H. neesianus* pode ser classificada como do tipo ordenada de aproximação. Esse mecanismo é considerado altamente eficaz, pois mesmo a ligeira separação espacial das anteras e estigmas pode impedir a deposição de pólen endógeno dentro das flores (Webb and Lloyd 1986). Assim, é possível que a hercogamia mantida em *H. neesianus* não precise atingir grandes distâncias, justificando os altos valores de inacurácia para esse atributo tendo o uropatágio como ótimo. Se por um lado modelos ideais de hercogamia podem evoluir mais rápido que às estruturas reprodutivas, por outro, morfologias florais complexas podem gerar padrões desconhecidos de seleção neste atributo (Opedal et al. 2017). A morfologia floral de *H. neesianus* foge ao padrão ideal devido a curvatura de suas estruturas reprodutivas. Assim, além do comprimento, outros atributos de filetes e estiletes devem ser considerados, tais como o apoio no lábio superior e suas flexibilidades. De fato, a flexibilidade dos conectivos de estruturas reprodutivas pode ter um papel fundamental nos mecanismos para prevenir ou promover a autopolinização (Krieck et al. 2008; Ruan et al. 2009).

Considerando que *Harpochilus neesianus* tem auto índice de autocompatibilidade e baixa autofertilidade, sua hercogamia atua principalmente prevenindo a autopolinização e não o entupimento do estigma. Assim, o sistema é eficiente em evitar até mesmo a autopolinização facilitada, promovida por polinizadores (*sensu* Webb and Lloyd 1986). Na hercogamia orientada de aproximação, mesmo após o contato com as anteras, a deposição de pólen endógeno pode ser evitada se as rotas de aproximação e partida diferem ou se a área receptiva do estigma está direcionado para fora (Webb and Lloyd 1986). Ambas condições são atendidas em *H. neesianus*: tanto a posição do estigma cuja a superfície receptiva é voltada para frente; quanto à movimentação dos morcegos que são animais que comumente aproximam-se de flores frontalmente e afastam-se lateralmente em uma manobra evasiva (ver compilado de vídeos Muchhala 2018).

Evitando a interferência polínica

Além da total ausência de pólen interespecífico nos estigmas de *Harpochilus neesianus*, três fatores nos levam a acreditar que a interferência polínica pode ser a principal explicação para sua morfologia. O primeiro deles é sua ocorrência na Caatinga, um dos locais no mundo com a maior proporção de flores polinizadas por morcegos (Machado and Lopes 2004). O segundo é a polinização por um morcego tão generalista. Isso deve gerar fortes processos de perda de pólen, não apenas pela sobreposição de grãos de várias espécies sobre o corpo do

animal (Figura 1), como pela diminuição da carga polínica em visitas a flores não co-específicas (Grant 1994; Muchhala and Thomson 2012; Armbruster 2014; Arceo-Gómez et al. 2016). Por fim, *H. neesianus* floresce o ano inteiro (Vogel et al 2005), estando sujeito a possível interferência de quaisquer espécies quiropterófilas simpátricas. Tem sido demonstrado que plantas polinizadas por morcegos podem evitar a interferência polínica ao depositar grãos de pólen em diferentes partes do corpo do polinizador (Howell 1977; Stewart and Dudash 2017; Muchhala and Thomson 2012). Nesse sentido, dados da literatura e evidências morfológicas das flores polinizadas por morcegos na Caatinga (Tabela 4) nos dão uma importante pista sobre como *H. neesianus* explora com exclusividade um local no corpo dos morcegos: o uropatágio.

Entre as diferentes estratégias de deposição de pólen sobre o corpo dos polinizadores é possível distinguir dois extremos: i) espalhar pólen no máximo possível do corpo do animal a fim de aumentar a probabilidade que o estigma capture pólen independentemente de onde toque (ocorre em algumas flores do tipo pincel - (Faegri and Pijl 1979); ou ii) otimizar a deposição de pólen e contatos do estigma em uma região específica do polinizador (Armbruster et al. 2014). Na Caatinga a maioria as plantas parece ter seguido a primeira estratégia (Tabela 4). Há uma grande quantidade de plantas da família Cactaceae cuja o anel formado pelas muitas anteras é capaz de espalhar pólen sobre toda a cabeça e partes iniciais do corpo do animal (ex: *Pilosocereus* spp. - Rocha et al. 2007). Há também diversas flores do tipo pincel ou disco, cuja o grande número de estames pode tocar diversas partes do corpo do animal ou restringir-se apenas ao seu focinho a depender do tamanho de seus filetes (ex: *Mimosa lewiise*, Vogel et al. 2004). Para essas espécies, é possível que esteja havendo uma intensa seleção sobre a função masculina (Muchhala and Thomson 2012)

Em relação as flores que utilizam a estratégia de explorar um local pontual no corpo dos morcegos, a maioria delas o faz através de deposição nas partes ventrais ou nas porções iniciais do pescoço ou costas (Tabela 4). Outro exemplo notável de morfologia extrema na polinização por morcegos na Caatinga é o gênero *Helicteris*, cuja o longo androginóforo curva-se alcançando porções finais do abdômen do morcego (Sazima 1988). A morfologia destas espécies e de outras que realizam deposição de pólen na cauda ou pés de beija flores tem sido associada a fuga da interferência polínica (Franceschinelli 2005). Considerando que em *Helicteris* esse ajuste se dá pelo alongamento do androginóforo que porta anteras e estigmas em seu ápice (Sazima 1988; Franceschinelli 2005), o sistema de *Harpochilus neesianus* é mais complexo, desde que envolve o alongamento integrado do lábio superior, filetes e estilete.

Nenhuma destas das flores quiropterófilas de Caatinga parece ter estruturas reprodutivas que alcancem o uropatágio, deixando *H. neesianus* fora da disputa. Até onde sabemos, este é o primeiro caso de uma flor especializada em explorar esse local no corpo dos morcegos. A deposição de pólen em locais improváveis permite acessar de forma única alguns polinizadores, este é o caso da deposição de pólen ou políneas em línguas de pássaros (Pauw 1998), caudas de beija-flores (Franceschinelli 2005), asas de abelhas (Holmqvist et al. 2005) e pernas mariposas ou esfingídeos (Peter et al. 2009; Mochizuki et al. 2017). Enquanto algumas dessas podem estar associadas à restrições morfológicas florais (Pauw 1998; Mochizuki et al. 2017), outras estratégias podem resultar de uma intensa pressão evolutiva frente a disputa de espaço no corpo do polinizador (Pauw 2006b). Esta última parece ser o caso de *H. neesianus*, gênero que evoluiu a partir de espécies *Justicieae* (Acanthaceae) que tem flores nototribicas com estruturas reprodutivas bem mais curtas (Kiel et al. 2018).

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao PELD-Catimbau (CNPq 459485 / 2014-8) e à FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco) que apoiaram esta pesquisa.

REFERÊNCIAS

- Abràmoff, M D, Magalhães, P J, Ram, S J (2004) Image processing with ImageJ. *Biophotonics international*, 11: 36-42
- Straka J R, Starzomski B M (2014) Humming Along or buzzing off? The elusive consequences of plant-pollinator mismatches. *Journal of Pollination Ecology*, 13: 129-145
- Aguiar L M S, Bernard E, Machado R B (2014) Habitat use and movements of *Glossophaga soricina* and *Lonchophylla dekeyseri* (Chiroptera: Phyllostomidae) in: a Neotropical savannah. *Zool* 31:223–229. doi: 10.1590/S1984-46702014000300003
- Arceo-Gómez G, Abdala-Roberts L, Jankowiak A, et al (2016) Patterns of among- and within-species variation in heterospecific pollen receipt: The importance of ecological generalization. *Am J Bot* 103:396–407. doi: 10.3732/ajb.1500155
- Arditti J, Elliott J, Kitching I J, Wasserthal L T (2012) ‘Good Heavens what insect can suck it’ - Charles Darwin, *Angraecum sesquipedale* and *Xanthopan morganii praedicta*. *Bot J Linn Soc* 169:403–432. doi: 10.1111/j.1095-8339.2012.01250.x

Armbruster W S (2014) Floral specialization and angiosperm diversity: phenotypic divergence, fitness trade-offs and realized pollination accuracy. *AoB Plants* 6. doi: 10.1093/aobpla/plu003

Armbruster W S, Hansen T F, Pelabon C, et al (2009a) The adaptive accuracy of flowers: measurement and microevolutionary patterns. *Ann Bot* 103:1529–1545. doi: 10.1093/aob/mcp095

Armbruster W S, Muchhala N (2009) Associations between floral specialization and species diversity: cause, effect, or correlation? *Evol Ecol* 23:159–179. doi: 10.1007/s10682008-9259-z

Armbruster W S, Pélabon C, Hansen T F, Bolstad G H (2009b) Macroevolutionary patterns of pollination accuracy: a comparison of three genera. *New Phytol* 183:600–617. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.02930.x

Armbruster W S, Shi X-Q, Huang S-Q (2014) Do specialized flowers promote reproductive isolation? Realized pollination accuracy of three sympatric *Pedicularis* species. *Ann Bot* 113:331–340. doi: 10.1093/aob/mct187

Ashworth L, Aguilar R, Galetto L, Aizen M A (2004) Why do pollination generalist and specialist plant species show similar reproductive susceptibility to habitat fragmentation? *J Ecol* 92:717–719. doi: 10.1111/j.0022-0477.2004.00910.x

Astúa D., Guerra, D. Q. (2008). Caatinga bats in the Mammal Collection of the Universidade Federal de Pernambuco. *Chiroptera Neotropical* 14: 326-338.

Bascompte J, Jordano P, Melián C J, Olesen J M (2003) The nested assembly of plant-animal mutualistic networks. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:9383–7. doi: 10.1073/pnas.1633576100

Bezerra E S, Lopes AV, Machado I C (2009) Biologia reprodutiva de *Byrsonima gardnerana* A. Juss. (Malpighiaceae) e interações com abelhas *Centris* (Centridini) no nordeste do Brasil. *Rev Bras Botânica* 32:95–108. doi: 10.1590/S0100-84042009000100010

Borrell B J (2005) Long Tongues and Loose Niches: Evolution of Euglossine Bees and Their Nectar Flowers1. *Biotropica* 37:664–669. doi: 10.1111/j.1744-7429.2005.00084.x

Herrera, C. M. (1993). Selection on complexity of corolla outline in a hawkmothpollinated violet. *Evol Trends Plants*, 7, 1.

Carneiro LT, Aguiar A J C, Martins C F, et al (2015) *Krameria tomentosa* oil flowers and their pollinators: Bees specialized on trichome elaiophores exploit its epithelial oil glands. *Flora - Morphol Distrib Funct Ecol Plants* 215:1–8. doi: 10.1016/J.FLORA.2015.06.002

Carter G G, Ratcliffe J M, Galef B G (2010) Flower Bats (*Glossophaga soricina*) and

Fruit Bats (*Carollia perspicillata*) Rely on Spatial Cues over Shapes and Scents When Relocating Food. PLoS One 5:e10808. doi: 10.1371/journal.pone.0010808

Côrtes A L A, Rapini A (2013) *Justicieae* (Acanthaceae) do Semiárido do Estado da Bahia, Brasil. Hoehnea 40:253–292. doi: 10.1590/S2236-89062013000200003

Cruden R W (1977) Pollen-ovule ratios: A conservative indicator of breeding systems in flowering plants. Evolution (NY) 31:32–46. doi: 10.1111/j.1558-5646.1977.tb00979.x

Cruden R W, Miller-Ward S (1981) Pollen-ovule ratio, pollen size, and the ratio of stigmatic area to the pollen-bearing area of the pollinator: An hypothesis. Evolution (NY) 35:964–974. doi: 10.1111/j.1558-5646.1981.tb04962.x

Domingos-Melo A, Nadia T de L, Machado I C (2018) At the beginning and at the end: Combined mechanisms of prior and delayed self-pollination interact to make a “winner” species. Flora 249:24–30. doi: 10.1016/J.FLORA.2018.09.007

Edith A, Cadenillas R, Pacheco V (2009) Diet of nectarivorous bats from the National Park Cerros de Amotape, Tumbes. Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Eisikowitch D, Ghara M (2017) An overview on Ficus pollination. Acta Horti pp 143–148. doi: 10.17660/ActaHortic.2017.1173.24

Erbar C, Langlotz M (2005) Pollen to ovule ratios: standard or variation — a compilation. Bot Jahrbücher 126:71–132. doi: 10.1127/0006-8152/2005/0126-0071

Faegri K, Van Der Pijl L (1979) Principles of Pollination Ecology. Elsevier Science

Fenster C B, Martén-Rodríguez S (2007) Reproductive Assurance and the Evolution of Pollination Specialization. Int J Plant Sci 168:215–228. doi: 10.1086/509647

Fleming TH, Geiselman C, Kress WJ (2009) The evolution of bat pollination: a phylogenetic perspective. Ann Bot 104:1017–1043. doi: 10.1093/aob/mcp197

Fleming TH, Muchhala N (2008) Nectar-feeding bird and bat niches in two worlds: pantropical comparisons of vertebrate pollination systems. J Biogeogr 35:764–780. doi: 10.1111/j.1365-2699.2007.01833.x

Franceschinelli EV (2005) The pollination biology of two species of *Helicteres* (Malvaceae) with different mechanisms of pollen deposition. Flora - Morphol Distrib Funct Ecol Plants 200:65–73. doi: 10.1016/J.FLORA.2004.05.002

Gomes A P de S, Rodal M J N, Melo A L de (2006) Florística e fitogeografia da vegetação arbustiva subcaducifolia da Chapada de São José, Buíque, PE, Brasil. Acta Bot Brasilica 20:37–48. doi: 10.1590/S0102-33062006000100005

Grant V (1994) Modes and origins of mechanical and ethological isolation in angiosperms. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:3–10. doi: 10.1073/PNAS.91.1.3

Gribel R, Gibbs P E (2002) High Outbreeding as a Consequence of Selfed Ovule Mortality and Single Vector Bat Pollination in the Amazonian Tree *Pseudobombax munguba* (Bombacaceae). *Int J Plant Sci* 163:1035–1043. doi: 10.1086/342518

Howell D J (1977) Time sharing and body partitioning in bat–plant pollination systems. *Nature* 270:509–510. doi: 10.1038/270509a0

Huang Z-H, Liu H-L, Huang S-Q (2015) Interspecific pollen transfer between two coflowering species was minimized by bumblebee fidelity and differential pollen placement on the bumblebee body. *J Plant Ecol* 8:109–115. doi: 10.1093/jpe/rtv015

J. Per-Henrik Holmqvist, Manktelow M, Thomas F D (2005) Wing pollination by bees in *Mexacanthus* (Acanthaceae)? *Acta Botánica Mex* 71:11-17

Johnson S D, Steiner K E (1997) Long-Tongued fly pollination and evolution of floral spur length in the *Disa draconis complex* (Orchidaceae). *Evolution* (N Y) 51:45–53. doi: 10.1111/j.1558-5646.1997.tb02387.x

Kriek C, Finatto, Müller T et al (2008) Biologia reprodutiva de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B L Burtt, amp; R M Sm. (Zingiberaceae) em Florianópolis, Santa Catarina. *Rev Bras Plantas Med* 10:103–110

Kunte K (2007) Allometry and functional constraints on proboscis lengths in butterflies. *Funct Ecol* 21:982–987. doi: 10.1111/j.1365-2435.2007.01299.x

Lemke T O (1984) Foraging Ecology of the Long-Nosed Bat, *Glossophaga Soricina*, With Respect to Resource Availability. *Ecology* 65:538–548. doi: 10.2307/1941416

Lemke T O (1985) Pollen Carrying by the Nectar-Feeding Bat *Glossophaga soricina* in a Suburban Environment. *Biotropica* 17:107. doi: 10.2307/2388502

Lindberg A B, Olesen J M (2001) The fragility of extreme specialization: *Passiflora mixta* and its pollinating hummingbird *Ensifera ensifera*. *J Trop Ecol* 17:323–329. doi: 10.1017/S0266467401001213

Lloyd D G, Webb C J (1986) The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigmas in angiosperms I. Dichogamy. *New Zeal J Bot* 24:135–162. doi: 10.1080/0028825X.1986.10409725

Louzada N S V, Pessôa L M (2013) Morphometric differentiation of *Glossophaga soricina soricina* (Chiroptera: Phyllostomidae) in three Brazilian biomes. *Zool* 30:419–423. doi: 10.1590/S1984-46702013000400007

Machado I C, Lopes A V (2004) Floral Traits and Pollination Systems in the Caatinga, a Brazilian Tropical Dry Forest. *Ann Bot* 94:365–376. doi: 10.1093/aob/mch152

Machado I C, Vogel S (2004) The North-east-Brazilian Liana, *Adenocalymna dichilum* (Bignoniaceae) Pollinated by Bats. *Ann Bot* 93:609–613. doi: 10.1093/aob/mch069

Machado I C, Vogel S, Lopes A V. (2002) Pollination of *Angelonia cornigera* Hook. (Scrophulariaceae) by Long-Legged, Oil-Collecting Bees in NE Brazil. *Plant Biol* 4:352–359. doi: 10.1055/s-2002-32325

Maêda J M (1985) Manual para uso da câmara de Neubauer para contagem de pólen em espécies florestais. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro

Memmott J, Craze P G, Waser N M, Price M V (2007) Global warming and the disruption of plant-pollinator interactions. *Ecol Lett* 10:710–717. doi: 10.1111/j.1461-0248.2007.01061.x

Milet-Pinheiro P, Carvalho AT, Kevan P G, Schlindwein C (2009) Permanent stigma closure in Bignoniaceae: Mechanism and implications for fruit set in self-incompatible species. *Flora - Morphol Distrib Funct Ecol Plants* 204:82–88. doi: 10.1016/J.FLORA.2007.11.006

Milet-Pinheiro P, Schlindwein C (2009) Pollination in *Jacaranda rugosa* (Bignoniaceae): euglossine pollinators, nectar robbers and low fruit set. *Plant Biol* 11:131–141. doi: 10.1111/j.1438-8677.2008.00118.x

Mitchell R J, Karron J D, Holmquist K G, Bell JM (2004) The influence of *Mimulus ringens* floral display size on pollinator visitation patterns. *Funct Ecol* 18:116–124. doi: 10.1111/j.1365-2435.2004.00812.x

Mochizuki K, Furukawa S, Kawakita A (2017) Pollinia transfer on moth legs in *Hoya carnos* (Apocynaceae). *Am J Bot* 104:953–960. doi: 10.3732/ajb.1700078

Moré M, Amorim F W, Benitez-Vieyra S, et al (2012) Armament Imbalances: Match and Mismatch in Plant-Pollinator Traits of Highly Specialized Long-Spurred Orchids. *PLoS One* 7:e41878. doi: 10.1371/journal.pone.0041878

Muchhala N (2006) Nectar bat stows huge tongue in its rib cage. *Nature* 444:701–702. doi: 10.1038/444701a

Muchhala N, Thomson JD (2012) Interspecific competition in pollination systems: costs to male fitness via pollen misplacement. *Funct Ecol* 26:476–482. doi: 10.1111/j.1365-2435.2011.01950.x

Muchhala N, Thomson J D (2009) Going to great lengths: selection for long corolla tubes in an extremely specialized bat-flower mutualism. *Proceedings Biol Sci* 276:2147–52. doi: 10.1098/rspb.2009.0102

Muchhala N, Thomson J D (2010a) Fur versus feathers: pollen delivery by bats and hummingbirds and consequences for pollen production. *Am Nat* 175:717–26. doi: 10.1086/652473

Muchhala N, Thomson J D (2010b) Fur versus feathers: pollen delivery by bats and hummingbirds and consequences for pollen production. *Am Nat* 175:717–26. doi: 10.1086/652473

Nadia T D L, De Menezes N L, Machado I C (2013) Floral traits and reproduction of *Avicennia schaueriana* Moldenke (Acanthaceae): a generalist pollination system in the *Lamiales*. *Plant Species Biol* 28:70–80. doi: 10.1111/j.1442-1984.2011.00361.x

Nattero J, Cocucci A A, Medel R (2010) Pollinator-mediated selection in a specialized pollination system: matches and mismatches across populations. *J Evol Biol* 23:1957–1968. doi: 10.1111/j.1420-9101.2010.02060.x

Nilsson L A (1988) The evolution of flowers with deep corolla tubes. *Nature* 334:147–149. doi: 10.1038/334147a0

Ollerton J, Killick A, Lamborn E, et al Multiple meanings and modes: on the many ways to be a generalist flower

Opedal Ø H, Bolstad G H, Hansen T F, et al (2017) The evolvability of herkogamy: Quantifying the evolutionary potential of a composite trait. *Evolution (N Y)* 71:1572–1586. doi: 10.1111/evo.13258

Pauw A (2006a) Floral syndromes accurately predict pollination by a specialized oilcollecting bee (*Rediviva peringueyi*, Melittidae) in a guild of South African orchids (Coryciinae). *Am J Bot* 93:917–926. doi: 10.3732/ajb.93.6.917

Pauw A (1998) Pollen transfer on birds' tongues. *Nature* 394:731–732. doi: 10.1038/29421

Peter C I, Coombs G, Huchzermeyer CF, et al (2009) Confirmation of hawkmoth pollination in *Habenaria epipactidea*: Leg placement of pollinaria and crepuscular scent emission. *South African J Bot* 75:744–750. doi: 10.1016/J.SAJB.2009.08.007

Queiroz J A, Quirino Z G M, Lopes A V, Machado I C (2016) Vertebrate mixed pollination system in *Encholirium spectabile*: A bromeliad pollinated by bats, opossum and hummingbirds in a tropical dry forest. *J Arid Environ* 125:21–30. doi: 10.1016/J.JARIDENV.2015.09.015

Queiroz J A, Quirino Z G M, Machado I C (2015) Floral traits driving reproductive isolation of two co-flowering taxa that share vertebrate pollinators. *AoB Plants* 7:plv127. doi: 10.1093/aobpla/plv127

Ratto F, Simmons B I, Spake R, et al (2018) Global importance of vertebrate pollinators for plant reproductive success: a meta-analysis. *Front Ecol Environ* 16:82–90. doi: 10.1002/fee.1763

Ribeiro E M S, Arroyo-Rodríguez V, Santos B A, et al (2015) Chronic anthropogenic disturbance drives the biological impoverishment of the Brazilian Caatinga vegetation. *J Appl Ecol* 52:611–620. doi: 10.1111/1365-2664.12420

Rito K F, Arroyo-Rodríguez V, Queiroz R T, et al (2017) Precipitation mediates the effect of human disturbance on the Brazilian Caatinga vegetation. *J Ecol* 105:828–838. doi: 10.1111/1365-2745.12712

Rocha E A, Machado I C, Zappi D C (2007) Floral biology of *Pilosocereus tuberculatus* (Werderm.) Byles, amp; Rowley: a bat pollinated cactus endemic from the “Caatinga” in northeastern Brazil. *Bradleya* 25:129–144. doi: 10.25223/brad.n25.2007.a10

Rodriguez L J, Bain A, Chou L-S, et al (2017) Diversification and spatial structuring in the mutualism between *Ficus septica* and its pollinating wasps in insular South East Asia. *BMC Evol Biol* 17:207. doi: 10.1186/s12862-017-1034-8

Ruan C-J, Mopper S, da Silva JAT, et al (2009) Context-dependent style curvature in *Kosteletzkya virginica* (Malvaceae) offers reproductive assurance under unpredictable pollinator environments. *Plant Syst Evol* 277:207–215. doi: 10.1007/s00606-008-0127-7

Sahley C T, Horner M A, Fleming T H (1993) Flight Speeds and Mechanical Power Outputs of the Nectar-Feeding Bat, *Leptonycteris curasoae* (Phyllostomidae: Glossophaginae). *J Mammal* 74:594–600. doi: 10.2307/1382278

Sánchez-Casas N, Alvarez T (2000) Palinofagia De Los Murcielagos Del Genero *Glossophaga* (Mammalia: Chiroptera) E Mexico. Instituto de Ecología.

Kiel C A, Daniel T F, McDade L A. (2018). Phylogenetics of New World ‘justicioids’(Justicieae: Acanthaceae): Major Lineages, Morphological Patterns, and Widespread Incongruence with Classification. *Systematic Botany*, 43(2), 459-484.

Sazima M (1988) *Helicteres ovata* (Sterculiaceae), Pollinated by Bats in Southeastern Brazil. *Bot Acta* 101:269–271. doi: 10.1111/j.1438-8677.1988.tb00043.x

Silva Monteiro F K Da, Fernando E M P, Lucena M D F A, Melo J I M De (2018) A new species of northeastern Brazilian endemic genus *Harpochilus* (Acanthaceae) Flora of

Paraíba, Brazil View project Flora of Paraíba, Brazil View project. Phytotaxa 358:289–294. doi: 10.11646/phytotaxa.358.3.6

Specht C D, Howarth D G (2015) Adaptation in flower form: a comparative evodevo approach. New Phytol 206:74–90. doi: 10.1111/nph.13198

Stang M, Klinkhamer P G L, van der Meijden E (2007) Asymmetric specialization and extinction risk in plant–flower visitor webs: a matter of morphology or abundance? Oecologia 151:442–453. doi: 10.1007/s00442-006-0585-y

Stewart A B, Dudash M R (2017) Field evidence of strong differential pollen placement by Old World bat-pollinated plants. Ann Bot 119:73–79. doi: 10.1093/aob/mcw212

Tripp E A, Manos P S (2008) Is floral specialization an evolutionary dead-end pollination sytem transitions in Ruellia (Acanthaceae). Evolution (NY) 62:1712–1737. doi: 10.1111/j.1558-5646.2008.00398.x

Tschapka M, Gonzalez-Terrazas T P, Knornschild M (2015) Nectar uptake in bats using a pumping-tongue mechanism. Sci Adv 1:e1500525–e1500525. doi: 10.1126/sciadv.1500525

Helversen O, Reyer H-U (1984) Nectar intake and energy expenditure in a flower visiting bat. Oecologia 63:178–184. doi: 10.1007/BF00379875

Vogel S, Lopes A V, Machado I C (2005a) Bat pollination in the NE Brazilian endemic *Mimosa lewisii*: an unusual case and first report for the genus. Taxon 54:693–700

Vogel S, Machado I C, Lopes A V (2005b) *Harpochilus neesianus* and other novel cases of chiropterophily in neotropical Acanthaceae. Taxon 53: 55-60.

Vogel S, Michener C D (1985) Long Bee Legs and Oil-Producing Floral Spurs, and a New Rediviva (Hymenoptera, Melittidae; Scrophulariaceae). J. Kansas Entomol. Soc. 58:359–364

Dassow G, Munro E (1999) Modularity in animal development and evolution: Elements of a conceptual framework for EvoDevo. J Exp Zool 285:307–325. doi: 10.1002/(SICI)1097-010X(19991215)285:4<307::AID-JEZ2>3.0.CO;2-V

Wasserthal L T (1997) The Pollinators of the Malagasy Star Orchids *Angraecum sesquipedale*, *A. sororium* and *A. compactum* and the Evolution of Extremely Long Spurs by Pollinator Shift. Bot Acta 110:343–359. doi: 10.1111/j.1438-8677.1997.tb00650.x

Webb C J, Lloyd D G (1986) The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigmas in angiosperms II. Herkogamy. New Zeal J Bot 24:163–178. doi: 10.1080/0028825X.1986.10409726

TABELAS

Tabela 1 – Acurácia reprodutiva e integração fenotípica das estruturas reprodutivas de *Harpochilus neesianus* (Acanthaceae) – PARNA Catimbau.

	Média±dp - cm -	Distância do ótimo (% ti)	Variância do atributo / cv / %ti	Variância do ótimo*/ cv / %ti	Inacurácia crua	Média ² - inacurácia escalonada	Correlação de Pearson / p ($\alpha=0.05$)	
							AD	SD
AD	5.85±0.85	0.51 / 13.14%	0.72 / 14.47% / 36.43%	0.99 / 15.67% / 50.43%	1.96	0.057	-	
SD	6.35±1.00	0.51 / 13.14%	0.99 / 15.67% / 50.43%	0.72 / 14.47% / 36.43%	1.96	0.049	0.85 / p<0.0001	-
HC	1.06±0.52	0.24 / 15.21%	0.273 / 49.35% / 74.43%	0.038 / 15.05% / 10.36%	0.37	0.327	0.02 / p=0.68	0.01 / p=0.84

(dp – desvio padrão; cv – coeficiente de variação; %ti – porcentagem de inacurácia total; AD – distância da antera a abertura do tubo floral; SD – distância do estigma da abertura do tubo floral; HC – hercogamia, distância entre antera e estigma)

* AD e SD são ótimos recíprocos; como medida do ótimo de HC utilizamos o comprimento médio do uropatágio.

Tabela 2 – Deposição de pólen sobre os estigmas de *Harpochilus neesianus* (Acanthaceae) – PARNA Catimbau.

Tratamentos	Flores	Estigmas com grãos de pólen (%)	Grãos de pólen sobre os estigmas polinizados
Endógeno	30	6 (20.00%) ^a	5±5 ^a
Exógeno	30	14 (46.66%) ^b	5±4 ^a
Total	227	100 (44.05%) ^b	7±4 ^a

*Nenhum grão de pólen inter específico encontrado

Letras diferentes indicam diferença significativa (p <0.05).

Tabela 3 – Sistema reprodutivo de *Harpochilus neesianus* (Acanthaceae) – PARNA Catimbau.

Tratamentos/Índices	Flores	Frutos (%)	Sementes por fruto
Agamospermia	30	0	
Autopolinização espontânea	30	4 (13.33%) ^a	2±2 ^a
Autopolinização manual	30	15 (50.00%) ^{b;c}	3±1 ^b
Polinização cruzada	30	23 (76.67%) ^b	3±1 ^b
Polinização natural	360	103 (28.61%) ^{a;c}	2±1 ^a
SCI		0.65	0.91
AFI		0.17	0.66
REI		0.37	0.70

SCI – índice de autoincompatibilidade (autopolinização manual/ polinização cruzada).

AFI – Índice de autofertilidade (autopolinização espontânea/ polinização cruzada)

RE - Índice de eficiência reprodutiva (polinização natural/ polinização cruzada)

Letras diferentes indicam diferença significativa (p <0.05).

Tabela 4 – Lista de espécies quiropterófilas cuja a distribuição se sobrepõe à de *Harpochilus neesianus* (Acanthaceae) em um raio de 500 km da população estudada (PARNA Catimbu) e seus locais esperados para deposição de pólen no corpo de *Glossophaga soricina*. (Z – simetria zigomorfa; A – simetria actinomorfa; s – dorso; cr – coroa; m – focinho; n – pescoço; ch – peito; b – abdômen; w – asas; *determinação a partir de inferências morfológicas; **determinação a partir de observações pessoais em campo)

Família	Espécie	Tipo floral	Local de deposição de pólen						
			s	cr	m	n	ch	b	w
Asteraceae	<i>Dasyphyllum sprengelianum</i> *	Brush pa	A						
Bromeliaceae	<i>Encholirium spectabile</i> ¹	Brush pa	A						
Cactaceae	<i>Pilosocereus catingicola</i> ²	Tube	Z						
	<i>P. chrysostele</i> ²	Tube	Z						
	<i>P. pachycladus</i> ²	Tube	Z						
	<i>P. tuberculatus</i> ³	Tube	Z						
Capparaceae	<i>Crataeva tapia</i> **	Brush pa	A						
	<i>Cynophalla flexuosa</i> **	Brush	A						
	<i>Neocalyptrocalyx longifolium</i> **	Brush	A						
Cleomaceae	<i>Tarenaya spinosa</i> ⁴	Flag	Z						
Convolvulaceae	<i>Ipomea marcellia</i> ⁵	Tube	Z						
	<i>I. vespetilia</i> ⁵	Tube	Z						
Fabaceae	<i>Bauhinia acurana</i> **	Flag	Z						
	<i>B. cheilantha</i> **	Flag	Z						
	<i>B. pentandra</i> **	Flag	Z						
	<i>Hymenaea cangaceira</i> **	Disc-like	A						
	<i>H. corbariu</i> ⁶	Disc-like	A						
	<i>H. martiana</i> **	Disc-like	A						
	<i>Mimosa lewisii</i> ⁷	Brush pa	A						
Lythraceae	<i>Lafoensia sp.</i> ⁸	Brush	A						
Malvaceae	<i>Ceiba glaziovii</i> **	Disc-like	Z						
	<i>Helicteres baruensis</i> ⁹	Tube	Z						
	<i>Luehea ochrophylla</i> *	Disc-like	A						
	<i>Pseudobombax marginatum</i> ¹⁰	Brush	A						
Passifloraceae	<i>Passiflora mucronata</i> ¹¹	Disc-like	Z						

FIGURAS

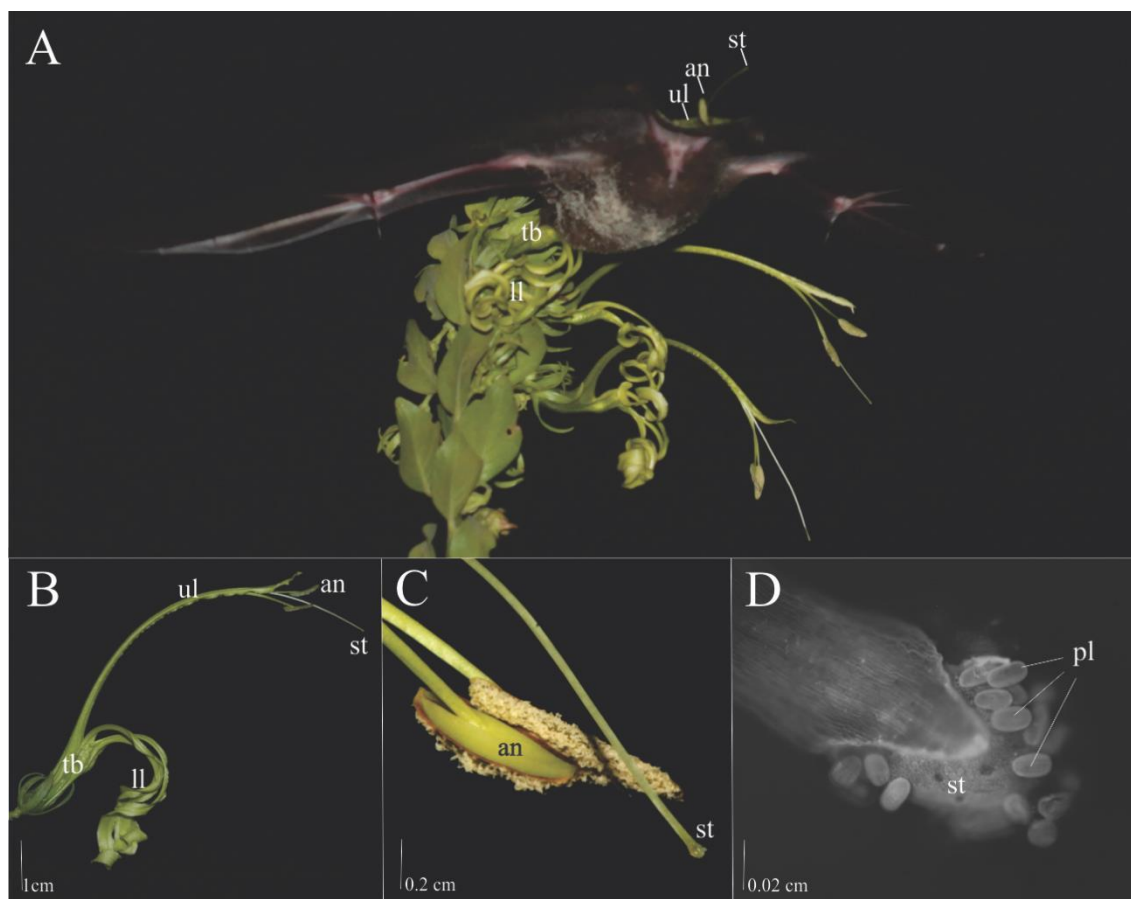


Figura 1. A – Visita do morcego glossophaga Sorician à flor de *Harpochilus neesinaus*. B – Detalhe da morfologia da flor em vista lateral. C – Detalhe de anteras e estigmas. D – Deposição de grãos de pólen no estigma. (tb – tubo floral; ll – lábio inferior; ul- uropatágio; an – antera; st – estigma; pl – grãos de pólen).

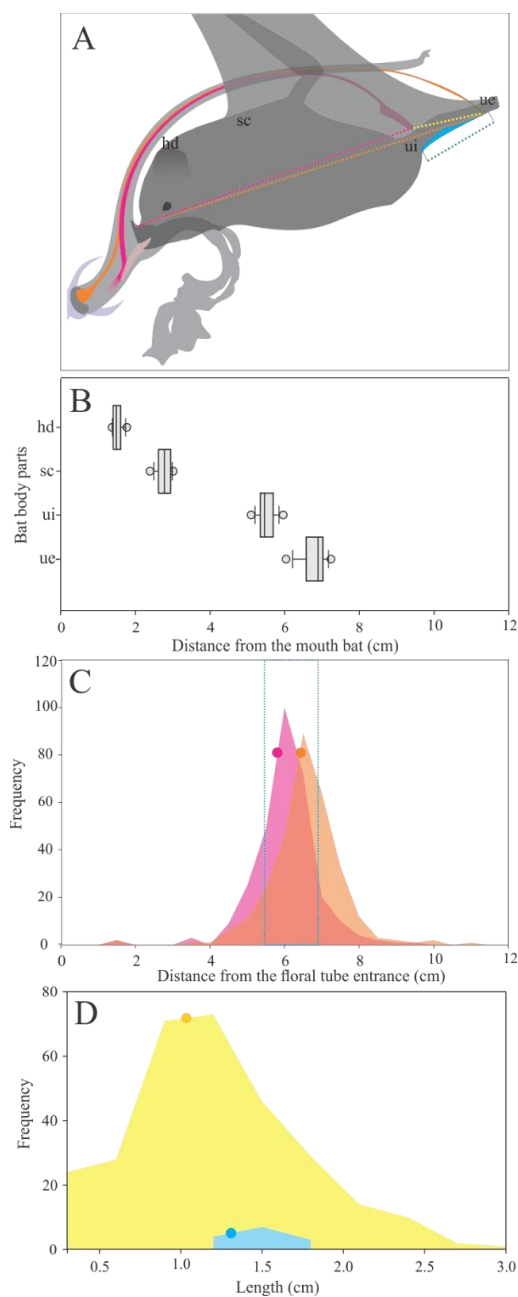


Figura 2. A – Esquema em vista lateral do contato das estruturas reprodutivas de *Harpochilus neesianus* com o corpo de morcego *Glossophaga soricina*. B – Distâncias da boca até diferentes partes do corpo do morcego. C – histogramas com as frequências das distâncias operacionais de anteras e estigmas. D – histograma com o comprimento dos uropatágios e hercogamia. (rosa – estame/distância operacional da antera; laranja – pistilo/distância operacional do estigma; amarelo – hercogamia; azul – uropatágio)

9 CONCLUSÃO

De diferentes formas, cada um dos capítulos nos permitiu avançar no estado da arte dos estudos sobre a polinização por morcegos. Parece que além dos atributos já bem conhecidos e consolidados da quiropterofilia, podem existir uma série de outras características nestas flores que podem ser igualmente importantes neste sistema de polinização. Assim, os manuscritos aqui apresentados abrem novas perspectivas e muitos deles põe em xeque alguns padrões vigentes. Abaixo elencamos os principais achados desta tese.

1. Diferente do que é comumente esperado, restrições ao acesso e menores disponibilidades de néctar podem promover maiores sucessos reprodutivos em flores polinizadas por morcegos.

2. A morfologia floral pode determinar a forma como néctar, frente diferentes concentrações e volumes, está sujeito a diferentes forças hidráulicas.

3. Néctar pode ter odor o que resultaria em processos de honestidade floral.

4. Flores polinizadas por morcegos refletem ultravioleta em padrões contínuos sobre suas superfícies, sendo a presença deste comprimento de onda capaz de fazer as flores serem visitadas com maior antedecência e conseqüentemente, gerando maiores frequências ao longo da noite.

5. As flores de morfologia complexa encontradas na quiropterofilia podem ser entendidas como fractais, estando essa fractalidade sujeita à processos de seleção fenotípica que favorecem flores mais compactas. Fortes evidências bioacústicas e de morfometria geométrica apontam para um papel da difusão sonora na sinalização floral.

6. Flores quiropterófilas precisam lidar com fortes pressões relacionadas ao ajuste ao corpo dos polinizadores, porém a interferência polínica e a manutenção da hercogamia podem ter papéis igualmente importantes.

Em sua conclusão, essa tese incita várias perguntas para além de suas respostas. Considerando a recente evolução da polinização por morcegos, bem como sua eficiência em direcionar os fenótipos das plantas com quem interagem, é de se esperar que encontremos vários casos na natureza “ensaiando” possíveis formas de aprimorar essa interação. Este trabalho contribuiu para tal percepção ampliando o conhecimento sobre essas possíveis alternativas a serem utilizadas pelas plantas na exploração de morcegos como polinizadores.

Em termos científicos, esperamos que essa tese seus produtos possam motivar futuros estudos nos próximos anos. Não obstante, é importante reforçar também a importância de divulgar esses achados em meio a sociedade. Assim, parte das informações presentes nesta tese são apresentadas em outras linguagens, que não a científica (Anexos desta tese), permitindo o seu acesso ao cidadão comum. Acreditamos que esse tipo de iniciativa contribui para a popularização e valorização da ciência, fortalecendo-a politicamente ao devolver para a sociedade o conhecimento financiado pela mesma. No caso específico desta tese, aumentando a compreensão sobre o meio ambiente ao trazer uma visão positiva em relação aos morcegos, dado o serviço ecossistêmico que entrega; e mostrando que as plantas da Caatinga não são apenas agentes passivos em uma paisagem seca, mas atuam em sistemas complexos de interação e desempenham importantes papéis no ecossistema.

10 ANEXOS

ANEXO I

LINKS DE NORMAS DAS REVISTAS PARA SUBMISSÃO DOS MANUSCRITOS

MANUSCRITO 1

Revista: Journal of Plant Ecology

Parágrafo inicial de descrição da revista: “*Journal of Plant Ecology (JPE)* is a bimonthly, peer-reviewed journal of plant ecology. *JPE* serves as an important medium for ecologists to present research findings and discuss challenging issues in the broad field of plants and their interactions with biotic and abiotic environment.”

Link de acesso às normas da revista:

https://academic.oup.com/jpe/pages/General_Instructions

MANUSCRITO 2

Revista: Biotropica

Parágrafo inicial de descrição da revista: “Biotropica is a highly regarded source of original research on the ecology, conservation and management of all tropical ecosystems, and on the evolution, behavior, and population biology of tropical organisms. Published on behalf of the Association of Tropical Biology and Conservation, the journal's Special Issues and Special Sections quickly become indispensable references for researchers in the field.”

Link de acesso às normas da revista:

<https://onlinelibrary.wiley.com/page/journal/17447429/homepage/forauthors.html>

MANUSCRITO 3

Revista: Ecology

Parágrafo inicial de descrição da revista: Ecology publishes articles that report on the basic elements of ecological research. Emphasis is placed on concise, clear articles documenting important ecological phenomena. The journal publishes a broad array of research that includes a rapidly expanding envelope of subject matter, techniques, approaches, and concepts: paleoecology through present-day phenomena; evolutionary, population, physiological, community, and ecosystem ecology, as well as biogeochemistry; inclusive of descriptive, comparative, experimental, mathematical, statistical, and interdisciplinary approaches.

Link de acesso às normas da revista:

<https://esajournals.onlinelibrary.wiley.com/hub/journal/19399170/resources/author-guidelines-ecy>

MANUSCRITO 4

Revista: Annals of Botany

Parágrafo inicial de descrição da revista: Annals of Botany is an international plant science journal publishing novel and rigorous research in all areas of plant science. It is published monthly in both electronic and printed forms with at least two extra issues each year that focus on a particular theme in plant biology. The Journal is managed by the Annals of Botany Company, a not-for-profit educational charity established to promote plant science worldwide.

Link de acesso às normas da revista:

https://academic.oup.com/aob/pages/General_Instructions

MANUSCRITO 5

Revista: Botanical Journal of the Linnean Society

Parágrafo inicial de descrição da revista: The *Botanical Journal of the Linnean Society* publishes original papers on systematic and evolutionary botany and comparative

studies of both living and fossil plants. Review papers are also welcomed which integrate fields such as cytology, morphogenesis, palynology and phytochemistry into a taxonomic framework. The *Journal* will only publish new taxa in exceptional circumstances or as part of larger monographic or phylogenetic revisions.

Link de acesso às normas da revista:

https://academic.oup.com/botlinnean/pages/General_Instructions

MANUSCRITO 6

Revista: The Science of Nature

Parágrafo inicial de descrição da revista: The Science of Nature - Naturwissenschaften- is Springer's flagship multidisciplinary science journal. The journal is dedicated to the fast publication and global dissemination of high-quality research and invites papers, which are of interest to the broader community in the biological sciences. Contributions from the chemical, geological, and physical sciences are welcome if contributing to questions of general biological significance. Particularly welcomed are contributions that bridge between traditionally isolated areas and attempt to increase the conceptual understanding of systems and processes that demand an interdisciplinary approach.

Link de acesso às normas da revista:

<https://www.springer.com/life+sciences/journal/114>

ANEXO II

DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA PRODUZIDA A PARTIR DESTA TESE**VIDEO SOBRE POLINIZAÇÃO POR MORCEGOS PRODUZIDO DURANTE A FINAL DO EURAXESS SCIENCE SLAM NO**

Link de acesso ao vídeo:

<https://www.youtube.com/watch?v=oMV8UPGS1xw&t=183s>

Comentário: “Game of Flowers”, “Pollinate Dead”, “House of Bats”, “Stranger Flowers”, “Smelling Bad” e “Ultravioleta is the new red”. Qualquer semelhança com as famosas séries da Netflix, popular provedor de filmes via streaming, não é mera coincidência. Doutorando da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e pesquisador do Laboratório de Biologia Floral e Reprodutiva (Polinizar) Arthur Domingos de Melo conquistou o público e a 5ª edição do Euraxess Science Slam Brazil 2017.

(Elisa Oswaldo-Cruz para Notícias da Academia Brasileira de Ciências – Link

<http://www.abc.org.br/2017/10/27/pernambucano-vence-euraxess-science-slam-brazil-2017com-parodia-da-netflix/>)

PODCAST SOBRE POLINIZAÇÃO PRODUZIDO PELO GRUPO DE DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA DRAGÕES DE GARAGEM



Link de acesso ao podcast:

<http://dragoesdegaragem.com/podcast/dragoes-de-garagem-129-polinizacao/>

Comentário: “Lucas Camargos (@lmcamargos), Vitor Nascimento (@vitornasc) e Natália Aguiar (@nataliaguiar_cs) convidam Artur Domingos, o ganhador do Science Slam 2017, para bater um papo sobre polinização. Entenda os diferentes tipos. Descubra como esse processo impactou a história evolutiva das plantas. Surpreenda-se com a relação entre agentes polinizadores e formato das flores. Desvende os motivos de porquê estudar esses complexos sistemas.”

(Texto retirado do próprio site onde está alocado o podcast).

SONETO SOBRE POLINIZAÇÃO POR MORCEGOS PRODUZIDO PARA O *MEDIA COACHING* OFERTADO PELO *EURAXESS SCIENCE SLAM BRAZIL 2018*

*Quiropterófila**

Nosso beijo doce é resolutivo

E só ocorre ao anoitecer
Mas serei néon para que possas ver
No crepúsculo, a luz que furto

Se tu segues a essência de luto
Que eu exalo até alvorecer
Quando em minhas curvas teu som bater
O amplifico ou disperso como vulto

É madrugada, te atrair eu tento
Desejo assaz ser teu alimento
Me derramando em gotas que somem

Se minha doçura tua língua quer
Bebida sob o que me faz mulher
Te espalho no corpo o que me faz homem

Comentário: O cientista falou também sobre a utilização da estética e do afeto como meios de atingir, além da dimensão técnica, a dimensão humana. Ele trabalhou o assunto introduzindo suas próprias experiências à apresentação, e por fim, apresentou o tema de sua pesquisa atual no poema “Quiropterófila”, unindo arte e ciência para falar sobre a polinização por morcegos. (Elisa Oswald-Cruz e Manuella Caputo para Notícias da Academia Brasileira de Ciências – Link <http://www.abc.org.br/2018/10/23/finalistas-do-euraxess-science-slam-2018-ganhamtreinamento-de-midia/>)

*Poesia classificada para a antologia poética “Prêmio Poesia Agora– Verão 2019” da Editora Trevo.