



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

CHARLANE MOURA DA SILVA

**PADRÕES DE DEPOSIÇÃO E CAPTAÇÃO DE PÓLEN E  
ESCOLHA DE FLORES MEDIADA POR POLINIZADORES EM  
*Senna aversiflora* (Herb.) H.S. Irwin & Barneby**

Recife

2023

CHARLANE MOURA DA SILVA

**PADRÕES DE DEPOSIÇÃO E CAPTAÇÃO DE PÓLEN E  
SELEÇÃO DE FLORES MEDIADA POR POLINIZADORES EM  
*Senna aversiflora* (Herb.) H.S. Irwin & Barneby**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Biologia Vegetal. Área de concentração: Ecologia e Conservação.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Isabel Cristina Machado

Coorientador: Prof. Dr. Arthur Domingos de Melo

Recife

2023

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Silva, Charlane Moura da.

Padrões de deposição e captação de pólen e escolha de flores mediada por polinizadores em *Senna aversiflora* (Herb.) H.S. Irwin & Barneby / Charlane Moura da Silva. - Recife, 2023. 108f.: il.

Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, 2023.

Orientação: Isabel Cristina Machado.

Coorientação: Arthur Domingos de Melo.

Inclui referências.

1. Polinização por vibração; 2. Flor de pólen; 3. Interações inseto-planta; 4. Simulação de visitas. I. Machado, Isabel Cristina. II. Melo, Arthur Domingos de. III. Título.

UFPE-Biblioteca Central

**CHARLANE MOURA DA SILVA**

**PADRÕES DE DEPOSIÇÃO E CAPTAÇÃO DE PÓLEN E  
SELEÇÃO DE FLORES MEDIADA POR POLINIZADORES EM  
*Senna aversiflora* (Herb.) H.S.Irwin & Barneby**

Dissertação defendida e aprovada em: 27 de fevereiro de 2023

Orientadora:

---

**Profa. Dra. Isabel Cristina Machado (Titular)**  
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE/PPGBV

Examinadores:

---

**Prof. Dr. Anselmo Nogueira (Titular)**  
Universidade Federal do ABC – UFABC

---

**Prof. Dr. Raphael Matias da Silva (Titular)**  
Universidade Federal de Jataí (UFJ)

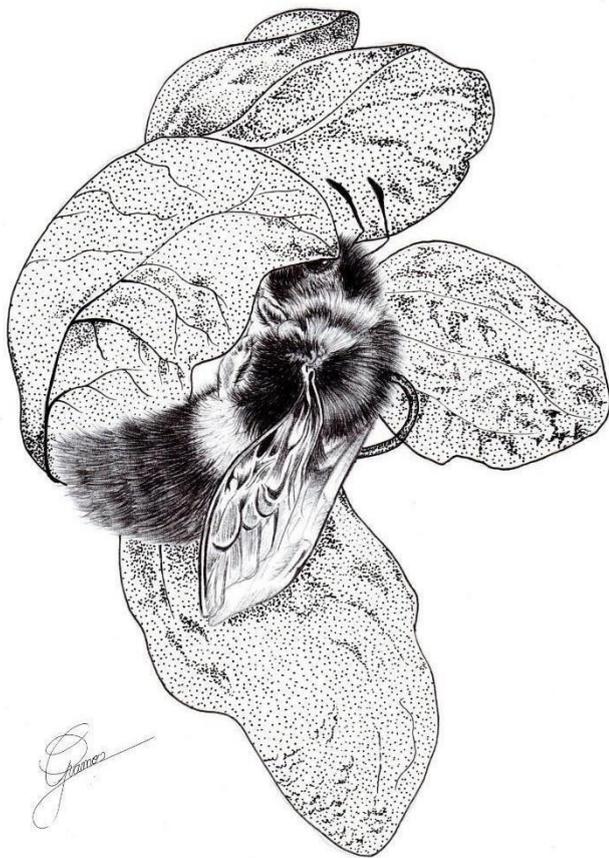
---

**Profa. Dra. Ana Carolina Galindo da Costa (Suplente)**  
Instituto Tecnológico do Vale

---

**Profa. Dra. Emília Cristina Pereira de Arruda (Suplente)**  
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE/PPGBV

**Dedico aos que me fortaleceram e acreditaram no meu potencial durante toda essa jornada. Em especial a minha orientadora e meus co-orientadores.**



“ [...] *Ou toca, ou não toca*”.  
(Eu: Clarice Lispector)

## AGRADECIMENTOS

*A Yeshua, pelas bênçãos em minha vida, por me permitir concluir mais esta etapa.*

*Aos meus amados pais, Arleane Moura e José Moura e minha mãe/vó Teresinha, por todo amor, apoio e força para que eu sempre possa buscar o que almejo. Obrigada por uma vida inteira de amor e por estarem presentes na minha vida. Sou grata por toda dedicação e cuidado. Eu amo vocês três!*

*Ao meu amado irmão Mey Moura, que sempre está ao meu lado, me incentivando me mostrando que sou capaz de tudo que me dedico em buscar e por se alegrar a cada conquista que alcanço. Obrigada por ser minha parte boa. Te amo!*

*Aos meus amados tios Agnaldo e Arnaldo, por sempre se alegrarem com minhas conquistas e me apoiarem na medida do que podem. E a minha amada mãe Sandra, por todo apoio, palavras de conforto e incentivo. Obrigada por comemorar minhas vitórias. Amo vocês!*

*Ao grupo de Pesquisa Fragilidade Ecológica em Angiospermas-GPFEA, por todas as trocas, pelo apoio durante essa minha jornada de crescimento. Sou grata pelas oportunidades que se tornaram possíveis graças ao apoio de vocês. Em especial aos companheiros de campo Joice e Ronaldo, grata por todo amparo e apoio.*

*Ao Laboratório de Biologia Floral e Reprodutiva, é um prazer poder ter ingressado nesse lindo POLINIZAR. Sou grata aos integrantes do grupo pelo acolhimento e por todas as conversas, apoio, aprendizado e descontração. Sou grata pelos ensinamentos diários, e por todas as contribuições importantes nesse estudo.*

*Ao pessoal do GPTAC pelos momentos de alegria e apoio, em especial ao Genesio. Obrigada por toda ajuda e pela dedicação, e principalmente pela confiança.*

*Agradeço ao Leo, Thaty, Carol e Bruna pelo apoio em diferentes etapas dessa jornada.*

*Aos meus amigos, por todo companheirismo, incentivo e apoio nas horas difíceis. Obrigada pela amizade real. Por vocês, sinto um amor tão puro, especial e verdadeiro. Obrigada por entender as minhas ausências constantes e por mesmo assim me amarem e cuidarem de mim. Vocês sem dúvidas, me fazem compreender ainda mais o verdadeiro sentido de uma boa amizade. Sou grata por sempre estarem ao meu lado, me fazendo acreditar que posso ir longe, basta não desistir de tentar.*

*Agradeço a Ednalva pela agradável, alegre e leve convivência durante os encontros no período de idas a campo. Sou grata por todo carinho, cuidado e pela amizade construída. E minha querida Jeci pelas conversas, incentivos, apoio e pelos "perrengues" compartilhados.*

*Agradeço desde aquelas que com uma ação, por mais simples que essa tenha sido, me proporcionaram grande ajuda. Em especial aos donos das áreas que realizei a coleta, a NORDESTA, ao ICMBio e UNEAL. Tenho enorme gratidão a cada um, que possivelmente não conseguirei expressar o suficiente. Sou grata por todo detalhe do acolhimento que recebi.*

*Pela formação, sou grandemente grata ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal e à Universidade Federal de Pernambuco e a todos os professores que passaram pela minha vida acadêmica durante essa formação no Mestrado. A vocês sou grata!*

*À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela bolsa de pesquisa do Mestrado e a CAPES pelo auxílio diário recebido.*

*A Camis pelo incentivo, paciência, companheirismo em todos os momentos. Pela sua ajuda em cada etapa da realização dos trabalhos em campo. Obrigada por todo carinho, atenção, e por sempre me segurar nos momentos difíceis ao longo desses dois anos. Sou grata pela sua irmandade e por não me deixar desistir. Grata por me fazer acreditar que era possível, e por todas as vezes que me fez desacelerar e ver que iria dar certo nessa fase final. Sou grata por você ter suportado o meu humor. Obrigada por todos os momentos de amizade, compreensão e alegria. Suas contribuições foram primordiais. Obrigada pelos seus valiosos detalhes.*

*Minha sincera gratidão aos examinadores do meu trabalho nas diferentes etapas dessa construção, obrigada pelas sugestões. Em especial, sou grata à banca examinadora da minha dissertação. Gratidão pelo seu tempo e pelas valiosas colocações.*

*A minha orientadora Dra. Isabel, por todo acolhimento, compreensão e por cada ensinamento. És um exemplo de profissional. Sou grata por você acreditar em mim e no meu potencial. Obrigada por ter possibilitado a oportunidade de fazer parte do seu grupo de pupilos e por ter me recebido de braços abertos. És uma mulher grandiosa, com uma história forte. E eu tenho sorte de ter sido orientada por alguém que tanto admiro e que durante esses dois anos me proporcionou momentos ricos em aprendizado em seu grupo. Obrigada pelas dicas em diversos momentos nos seminários, isso me possibilitou melhorar em diversos aspectos. Tenho um enorme carinho por você. Foi um privilégio ter uma mulher tão cheia de afeto e empatia em minha orientação. A você sou grata por tudo!*

*Ao meu coorientador Dr. Arthur, por todos os momentos de trocas, pelos ensinamentos e por toda paciência durante nossas conversas. Obrigada por toda empatia em seu posicionamento, pelos detalhes nas explicações. Sou grata por ter me acolhido com suas ações e falas. És um encanto de ser e tenho enorme admiração e carinho em ti. Sou grata por todas as suas contribuições, correções e palavras de carinho ao longo dessa etapa, e por ter me ajudado a deixar esse trabalho tão belo. Obrigada por tudo!*

*E por fim, sou infinitamente grata ao meu querido Professor Dr. Natan Almeida. Obrigada por sempre me estimular em descobrir e entender os processos e mecanismos que sempre achei tão complexo. Obrigada pela confiança, principalmente pela paciência e por sempre me mostrar que meu caminho é possível, sou grata por sempre compartilhar as suas experiências. És o meu maior exemplo de um excelente profissional. Sou grata por sempre me proporcionar momentos de aprendizagem, pela paciência e pelas preciosas e imprescindíveis orientações e colaborações durante meu processo de formação. Grata por estar sempre disponível nos momentos mais difíceis e cruciais. Serei eternamente grata por sua contribuição para meu crescimento profissional. Sem sua ajuda nada disso seria possível. Tenho grande carinho e muita admiração em ti. Grata!*

*Cada um de vocês faz parte do que sou hoje, e do meu crescimento futuro!  
A vocês sou grata*

## RESUMO

O gênero *Senna* Mill. (Fabaceae) possui flores enantiostílicas, polimorfismo afetado pela variação e covariação fenotípica intraespecífica, influenciando tanto a atração como o encaixe morfológico das abelhas polinizadoras durante a coleta de pólen. Nesta Dissertação, organizada em dois capítulos, buscamos analisar efeitos da enantiostilia usando como modelo *Senna aversiflora* (Herb.) H.S. Irwin & Barneby, espécie enantiostílica monomórfica. No primeiro capítulo analisamos i) a relação das dimensões das estruturas reprodutivas com a quantidade de pólen ofertada e ii) o efeito do polimorfismo floral na atração dos polinizadores, bem como sobre o sucesso reprodutivo, e no segundo capítulo investigamos a dinâmica de deposição e captação de pólen no corpo de diferentes visitantes florais. O trabalho de campo foi realizado na ReBio de Pedra Talhada-AL. Acessamos o fenótipo floral por meio de imagens digitais das pétalas, estames e gineceu de flores pré-ensacadas. Realizamos simulações de visitas utilizando modelos que reproduzem a morfologia corporal das abelhas polinizadoras e um sonificador para verificar a deposição e captação de pólen no corpo de diferentes abelhas. Monitoramos a frequência, o comportamento e a riqueza de abelhas visitantes. Espécies dos gêneros *Xylocopa*, *Eulaema*, *Bombus* e *Centris* foram consideradas polinizadores, apresentando comportamento de visita e coleta de pólen semelhante. Após as simulações, verificamos que os locais e amplitudes de deposição e captação de pólen podem variar, a depender da espécie do visitante, influenciados pelo ajuste morfológico e interação da abelha com a flor.

**Palavras-chave:** Polinização por vibração; Flor de pólen; interações inseto-planta; simulação de visitas.

## ABSTRACT

The genus *Senna* Mill. (Fabaceae) has enantiostyle flowers, polymorphism affected by intraspecific phenotypic variation and covariation, influencing both the attraction and the morphological fit of pollinating bees during pollen collection. In this Dissertation, organized into two chapters, we seek to analyze the effects of enantiostyly using *Senna aversiflora* (Herb.) H.S. Irwin & Barneby, monomorphic enantiostyle species. In the first chapter we analyze i) the relationship between the dimensions of the reproductive structures and the amount of pollen offered and ii) the effect of floral polymorphism on the attraction of pollinators, as well as on reproductive success, and in the second chapter we investigate the dynamics of deposition and capture of pollen in the body of different floral visitors. Fieldwork was carried out at ReBio de Pedra Talhada-AL. We accessed the floral phenotype through digital images of the petals, stamens and gynoecium of pre-bagged flowers. We carried out simulations of visits using models that reproduce the body morphology of pollinating bees and a sonicator to verify the deposition and capture of pollen in the body of different bees. We monitor the frequency, behavior and richness of visiting bees. Species of the genera *Xylocopa*, *Eulaema*, *Bombus* and *Centris* were considered pollinators, presenting similar visiting behavior and pollen collection. After the simulations, we verified that the places and amplitudes of pollen deposition and collection may vary, depending on the species of the visitor, influenced by the morphological adjustment and interaction of the bee with the flower.

**Keywords:** Buzz pollination; pollen flower; insect-plant interactions; visit simulation.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### ARTIGO 1 – Honestidade ignorada: abelhas preferem flores menores apesar da relação positiva entre tamanho floral e recompensa de pólen em *Senna aversiflora* (Fabaceae)

Figura 1 - Flores de *Senna aversiflora* mostrando a disposição das estruturas reprodutivas (A-C) em flores direita (A-B) e esquerda (C), e visita de abelha nas flores (D) 66

Figura 2 -Características florais associadas à quantidade de pólen ofertado por flor em *Senna aversifolia* (Fabaceae). A: Boxplot demonstrando a quantidade de grãos de pólen por tipo de anteras; B: Scatterplot demonstrando a relação entre a área total da flor com a quantidade de pólen ofertado pelas dois tipos de anteras 66

Figura 3 -Efeito da área total média das flores por indivíduo sobre a frequência de visitas de *Xylocopa grisescens*. A: Área total média das flores por indivíduo em relação a frequência das visitas; B: Boxplot demonstrando a ocorrência do efeito dos horários em relação a frequência de visitas; C: Frequência de visitas em diferentes horários em relação a área total média das flores por indivíduo (Legenda: **T1:** 7:00-8:00; **T2:** 8:00-9:00; **T3:** 9:00-10:00; **T4:** 10:00-11:00 e **T5:** 11:00-12:00) 67

### MATERIAL SUPLEMENTAR CAPÍTULO 1 68

Figura suplementar 1. Flores da espécie *Senna aversiflora* mostrando androceu heterântero (anteras de alimentação e anteras de polinização); exibindo a pétala curvada e posicionamento do gineceu em ambos os morfos florais. A-F: Morfo direito; G-L: Morfo esquerdo 68

Figura suplementar 2. Flores desmembradas; A: Morfo esquerdo; B: Morfo direito..... 69

Figura suplementar 3. Contagem de grãos de pólen com a câmara de Neubauer A: Remoção da anteras da flor de *Senna aversiflora*; B: Armazenamento da antera da flor com auxílio de pinça em tubo de Eppendorf; C: Anteras armazenadas em tubos de Eppendorf com álcool 70% (C1: anteras de alimentação, CII: anteras de polinização); D: Grãos de pólen homogeneizados em 1 ml da solução de ácido glicerinado; E: Visualização de grãos de pólen em Câmara de Neubauer com o auxílio de câmera acoplada ao microscópio óptico; F: Visualização da malha e dos quadrantes Câmara de Neubauer (FI: vista lateral da Câmara de Neubauer; FII: vista frontal da Câmara de Neubauer); G: Grade de contagem; H: Contagem em zigue-zague dos grãos de pólen contido nos setores do quadrante. I: Cálculo para obtenção da proporção do número de grãos de pólen por antera 69

Figura suplementar 4 - Modelo em 2D do estúdio fotográfico adaptado para obtenção de imagens em campo 70

Figura suplementar 5 - Algumas das principais abelhas polinizadoras das flores de *Senna aversiflora* (Herb.) H.S.Irwin & Barneby presentes no município de Quebrangulo, Alagoas, Brasil. A, B, D, F: *Xylocopa grisescens* realizando coleta

vibrátil de pólen; C e E: Aproximação de *Xylocopa grisescens* à flor. G, H, I: *Xylocopa* sp1 realizando coleta vibrátil de pólen 71

.....  
Figura suplementar 6. Espécies de abelhas pilhadoras em flores de *Senna aversiflora*. A, D, E: *Trigona spinipes* Fabricius (1793) mastigando antera para retirada de pólen, causando danos as anteras; B, C, F: Halictidae posicionada no ápice da antera promovendo vibração para a coleta de pólen 72

.....  
**ARTIGO 2 – Interação entre variação morfológica floral e diferentes polinizadores afeta a transferência de pólen promovendo relaxamento da enantioestilia: um experimento com simulacros de abelhas**

.....  
Figura 1 – (A-B) Detalhes da morfologia de flores de *Senna aversiflora* na Reserva Biológica de Pedra Talhada – Alagoas, Brasil. Visão frontal (A-B) e superior (C-D) do morfo esquerdo (A-C) e direito (B-D). Abreviaturas: pétala curvada (PC), anteras de alimentação (AA), anteras de polinização (AP), gineceu (G) 79

.....  
Figura 2 – Simulador de visitas em laboratório. (A) Hastes de suporte para abelha e flor; (B) Sonicador tocando a haste de fixação da flor para transmitir a vibração; (C) Abelha em biscoito posicionada na estrutura floral 81

.....  
Figura 3 – (A) Formato e tamanho dos diferentes simulacros em vista dorsal. (B) Vistas das faces dorsal, ventral, e posterior do corpo do simulacro ilustrando as áreas consideradas para averiguação do contato do estigma e deposição de pólen (adaptado de Tong & Huang, 2018) 82

.....  
Figura 4 – Representação das marcações para morfometria das estruturas florais de *Senna aversiflora* para mensuração da profundidade (A), afastamento horizontal e vertical (B). AA é a designação para anteras de alimentação, AP para anteras de polinização, E para estigma e P para pétala curvada 78

.....  
Figura 5 – Variação morfológica em flores de *Senna aversiflora*. (A) No gráfico de dispersão os pontos demonstram o posicionamento das estruturas florais com base nas medidas de distanciamento horizontal e vertical; (B-C) Gráficos de dispersão tridimensional das três medidas (horizontal, vertical e profundidade) mensuradas nas estruturas florais (Anteras de alimentação, antera de polinização, estigma e pétala); (D) Componentes da variação morfológicas estimados através de Modelos Lineares Mistos (LMM); (E) Gráfico da análise de componente principal (PCA) demonstrando as contribuições das variáveis de acordo com as dimensões florais dos morfos direito e esquerdo ao longo dos dois eixos 1 e 2 85

.....  
Figura 6 – Heatmaps mostrando os hotspots na frequência de contato do estigma (A) e deposição de pólen (B) das flores de *Senna aversiflora* (Fabaceae) sobre os diferentes simulacros de abelhas polinizadoras 88

.....  
Figura 7 – Heatmap com a probabilidade de fluxo polínico nos modelos das abelhas polinizadoras avaliados em flores de *Senna aversiflora*: Fluxo intramorfo (A) e intermorfo (B) 90

.....  
Figura 8 - Cenários demonstrando o efeito da morfologia floral em flores de *Senna aversiflora* em relação ao índice de efetividade nas abelhas *Centris* (A) e *Xylocopa* (B).

A linha de regressão linear está expressa em tom de vermelho 92

.....  
**Material** **suplementar** **capítulo** **2 104**

.....  
Figura 1. Simulacros demonstrando deposição de pólen em diferentes flores de morfo direito e esquerdo durante a simulação piloto: (A) primeira simulação; (B) quinta simulação; (C) sexta simulação; (D) sétima simulação 105

.....

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO 1 – Honestidade ignorada: abelhas preferem flores menores apesar da relação positiva entre tamanho floral e recompensa de pólen em *Senna aversiflora* (Fabaceae)

Tabela 1 – Média da morfometria dos verticilos florais e área total da corola. ( <b>Dp</b> : Desvio padrão; <b>AP</b> : Antera de polinização; <b>AA</b> : Antera de alimentação; * = significância com $p < 0.0001$ )	63
.....	
Tabela 2 - Fatores relacionados ao total de pólen em relação a área das anteras, pétalas e interação entre essas variáveis ( <b>Chisq</b> : qui-quadrado; <b>Df</b> : grau de liberdade; <b>p</b> : significância)	63
.....	
Tabela 3 - Frequência de visitas em 100 horas de observações em indivíduos de <i>Senna aversiflora</i> . <b>RV</b> : Resultado da visita: Polinizador (P) e Pilhador (PI).	63
.....	
..	
Tabela 4 - Resultado do efeito da área floral e horário na frequência de visitas de <i>Xylocopa grisescens</i> , em relação a abordagem por indivíduo e visitas às flores ( <b>Df</b> : grau de liberdade; <b>Deviance</b> : regressão; <b>Resid. Df</b> : graus de liberdade residuais; <b>Resid. Dev</b> : regressão residual; <b>p</b> : significância)	65
.....	
MATERIAL SUPLEMENTAR CAPÍTULO 1	68
.....	
Tabela suplementar 1. Medidas do comprimento corporal das abelhas visitantes de <i>Senna aversiflora</i>	72
.....	
<b>ARTIGO 2 – Interação entre variação morfológica floral e diferentes polinizadores afeta a transferência de pólen promovendo relaxamento da enantiostilia: um experimento com simulacros de abelhas</b>	
Tabela 1 – Medidas do comprimento corporal das abelhas e tamanho dos simulacros.	80
.....	
...	
Tabela 2 – Resultados da Mensuração horizontal, vertical e profundidade das partes florais. São indicados a Média $\pm$ desvio padrão (sd) dos morfos, bem como os valores de correlação com os dois primeiros eixos da PCA, e os resultados obtidos na MANOVA	86
.....	
...	
Tabela 3 – Efeitos do morfo floral (M), da espécie (EA) e da parte do corpo da abelha (PA) sobre a frequência de deposição de pólen e contato do estigma de <i>Senna aversiflora</i> (Fabaceae), determinados a partir de Modelos Lineares Generalizados com distribuição de erros de Poisson ( <b>Df</b> : grau de liberdade; <b>Deviance</b> : regressão; <b>Resid. Df</b> : graus de liberdade residuais; <b>Resid. Dev</b> : regressão residual; <b>p</b> : significância)	89
.....	
..	
Tabela 4 – Verificação da significância do efeito da morfologia floral em flores de <i>Senna aversiflora</i> em relação ao índice de efetividade nos quatro modelos de abelhas, para os dois primeiros Componentes Principais da PCA. ( <b>F</b> : estimativa do fluxo; <b>p</b> :	

significância)				92
.....				
...				
Material	Suplementar	Capítulo	2	104
.....				
Tabela 5 – Resultados dos modelos lineares mistos (LMMs), referentes a mensuração horizontal, vertical e profundidade das estruturas florais em relação ao componente da variação em uma verificação univariada. IEI: interindividual; IM: intermorfo; IAI: intraindividual; IF: intrafloral .....				104

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	17
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	19
2.1 Enantiostilia	19
2.2 Enantiostilia e polinização por vibração em <i>Senna</i> Mill.	20
2.3 Dinâmica de deposição e captação de pólen em <i>Cassiinae</i>	21
2.4 Variação do display floral e influência na dinâmica de visitas	23
2.5 Sinalização floral e seleção mediada por polinizadores	25
<b>REFERÊNCIAS</b>	28
<b>CAPÍTULO 1</b>	38
<b>Resumo</b>	39
<b>Introdução</b>	40
<b>Materiais e métodos</b>	42
<i>Área de estudo</i>	42
<i>Espécie estudada</i>	42
<i>Indivíduos amostrados</i>	42
<i>Dimensões das estruturas e quantidades de grãos de pólen</i>	43
<i>Observações focais</i>	43
<i>Análise dos dados</i>	44
<b>Resultados</b>	44
<i>Tamanhos das estruturas florais e disponibilidade de recurso</i>	44
<i>Frequência de visitas e amostragem dos visitantes florais</i>	45
<i>Efeito da área floral na frequência em função ao horário de visitas de <i>Xylocopa grisescens</i></i>	46

<b>Discussão</b>	46
<i>Tamanhos das estruturas florais e disponibilidade de recurso</i>	47
<i>Frequência de visitas e amostragem dos visitantes florais</i>	48
<i>Efeito da área floral na frequência em função ao horário de visitas de <i>Xylocopa grisescens</i></i>	49
<b>Agradecimentos</b>	52
<b>Referências</b>	52
<b>CAPÍTULO 2</b>	74
<b>RESUMO</b>	74
<b>ABSTRACT</b>	75
<b>INTRODUÇÃO</b>	77
<b>METODOLOGIA</b>	78
Local de estudo	78
Espécie estudada	78
Indivíduos amostrados	79
Modelo dos simulacros das abelhas	79
Simulações das visitas	80
Locais de deposição e captação de pólen	81
Morfometria floral	82
Análise dos dados	83
<b>RESULTADOS</b>	84
Variação morfológica em flores de <i>Senna aversiflora</i>	84
Dinâmica de deposição e captação de pólen	86
Efeito da variação morfológica na eficiência de deposição e captação de pólen	91
<b>DISCUSSÃO</b>	93

Varição morfológica em flores de <i>Senna aversiflora</i>	93
Dinâmica de deposição e captação de pólen	94
Efeito da variação morfológica na eficiência de deposição e captação de pólen	95
<b>Agradecimentos</b>	98
<b>REFERÊNCIAS</b>	98
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	106
<b>PERIÓDICOS</b>	107

## 1 INTRODUÇÃO

Fabaceae Lindl. é considerada uma das maiores famílias dentre as angiospermas, compreendendo 727 gêneros e aproximadamente 19.327 espécies (LWGP, 2017). Pertence à ordem Fabales (APG IV, 2016) e atualmente inclui seis subfamílias: Duparquetioideae LPWG, Cercidoideae LPWG, Detarioideae Burmeist., Dialioideae LPWG, Caesalpinioideae DC. (incluindo Mimosoideae DC.) e Papilionoideae DC., sendo, as duas últimas subfamílias contendo ao maior número de gêneros e espécies (LWGP, 2017). Caesalpinioideae é subdividida em quatro tribos: Detarieae, Caesalpinieae, Cercideae e Cassieae. Esta última tribo abrange a subtribo Cassiinae e dentro dela os gêneros *Cassia*, *Chamaecrista* e *Senna*.

Os gêneros da subtribo Cassiinae compartilham diversos caracteres morfológicos específicos (GOTTSBERGER, 1986). Espécies de *Senna*, por exemplo, possuem variação no posicionamento dos órgãos sexuais, ocasionando distintos locais de deposição e captação de pólen no corpo das abelhas (ALMEIDA *et al.*, 2015). As flores de *Senna* possuem anteras poricidas que dependem de abelhas capazes de gerar vibrações para liberação do grão de pólen, único recurso ofertado, e tais caracteres ocasionam uma estreita relação com abelhas de grande porte que refletem em mecanismos de interações com polimorfismos florais específicos (CARVALHO; OLIVEIRA 2003). Estes polimorfismos são caracterizados por diferentes expressões de morfos dentro de uma espécie, cuja função geralmente está relacionada à facilitação da xenogamia (BARRETT; JESSON; BAKER, 2000; JESSON; BARRETT, 2003). Essa expressão morfotípica é conhecida como enantiostilia, na qual, dentro da mesma espécie, existem duas formas florais no qual a posição dos órgãos sexuais difere reciprocamente, ou seja, o estilete de uma flor apresenta deflexão em relação ao eixo floral da outra, gerando flores direitas-D e esquerdas-E (ALMEIDA *et al.*, 2013a, b). Nesse tipo de polimorfismo floral, um morfo com estilete configurado à direita do eixo central da flor apresenta anteras posicionadas à esquerda (D), enquanto o morfo correspondente apresenta estilete à esquerda do eixo central e anteras à direita (E) (BARRETT, 2002; JESSON; BARRETT, 2003).

A enantiostilia pode ocorrer em dois tipos: dimórfico e monomórfico. No dimórfico, apenas um morfotipo floral (E ou D) ocorre por indivíduo, enquanto no monomórfico os dois morfotipos florais estão presentes em um mesmo indivíduo e pode variar de duas formas (JESSON; BARRETT, 2003; ALMEIDA *et al.*, 2013b). Na primeira forma, as inflorescências em um mesmo indivíduo possuem separadamente apenas flores D ou apenas flores E. Na segunda forma, ambos os morfotipos florais ocorrem dentro da mesma inflorescência, sendo

que essa distribuição pode seguir um padrão (não-aleatório) ou pode ser de forma aleatória (aleatório) (BARRETT, 2002; JESSON; BARRETT; DAY, 2003).

A funcionalidade de flores enantiostílicas pode estar relacionada ao favorecimento da transferência polínica entre morfotipos diferentes por xenogamia ou geitonogamia, dependendo se a enantiostilia for dimórfica ou monomórfica (IRWIN; BARNEBY, 1976; DULBERGER, 1981; FENSTER, 1995; LAPORTA, 2005). A ocorrência de diferentes morfotipos florais (D e E), formando imagens especulares, facilita a efetividade dos polinizadores na ação de transferência polínica entre os morfos. Essa relação pode ser evidenciada quando flores ditas esquerdas depositam pólen do lado direito do corpo do visitante e o estigma faz a captação no lado esquerdo, ocorrendo o inverso para flores ditas direitas (BAHADUR; CHATUVERDI; RAMA-SWARY, 1990). No entanto, a enantiostilia pode ter surgido como adaptação protetiva para o gineceu contra a ação de vibração por abelhas visitantes de flores melitófilas, que poderiam danificar facilmente a estrutura feminina da flor (DULBERGER, 1981; AMORIM *et al.*, 2017; ALMEIDA *et al.*, 2018). Contudo, ainda existem poucas abordagens em torno da enantiostilia monomórfica e ainda há a necessidade de um melhor entendimento de sua funcionalidade, já que por existir os dois morfos dentro do mesmo indivíduo, não evita a polinização geitonogâmica (JESSON; BARRETT, 2002).

Em espécies enantiostílicas, dimórficas ou monomórficas, espera-se que ocorra equilíbrio proporcional (1:1, denominada isopletia) de morfos D e E, entre os indivíduos que compõem uma população (LLOYD; WEBB, 1992). Esse equilíbrio é mantido pela atratividade igualitária de ambos os morfos aos polinizadores, uma vez que, independentemente da deflexão, ambos possuem quantidades de recursos florais (pólen) equiparados, o que resultaria em uma taxa similar de visitação de polinizadores entre morfos (LEEGE; WOLFE, 2002).

As flores usam atrativos como sinalização aos visitantes florais exibindo um conjunto de caracteres como tamanho, coloração, odor (GOULSON, 1999; GEGEAR; LAVERTY, 2001) e simetria, que podem indicar a presença de recursos florais. Essas características podem fazer com que polinizadores sejam atraídos para as flores, algumas das quais sinalizam honestamente a disponibilidade de seus recursos, mas algumas mostram uma abundância que não possuem de fato (PINHEIRO, 2014). Os animais podem usar destas sinalizações para visitar de forma preferencial as flores que oferecem mais recursos. Por exemplo, as abelhas podem visitar preferencialmente flores que possuem um display maior que possivelmente indique uma maior quantidade de pólen (WASER; PRICE, 1981; IRWIN; STRAUSS, 2005).

A maneira como os visitantes florais buscam alimentos é uma característica importante de seu comportamento e influenciando de diferentes maneiras em suas estratégias de

forrageamento, sendo mais vantajoso aumentar a obtenção de recursos disponibilizado pelas flores em um menor tempo de atividade de busca, dessa maneira, as plantas buscam estratégias que otimizem as taxas de visita (RICKLEFS; RELYEA, 2016; TOWNSEND; BEGON; HARPER, 2010). Assim, as plantas em sua maioria investem em atributos florais, como maior atração visual, que geralmente promovem maior visitação, a partir da maior disponibilidade de recursos oferecidos. Entretanto, o polinizador pode moderar seu reconhecimento floral pelas pegadas olfativas (*footprints*), as quais demonstram as flores que receberam visitas recentes (ELTZ, 2006; SALEH *et al.*, 2006). Tais estímulos, tanto olfativos como visuais, são informações que auxiliam no reconhecimento e na memorização por parte dos visitantes (KUNZE; GUMBERT, 2001), possibilitando uma melhor orientação em suas visitas, funcionando também como filtro por parte dos polinizadores.

O conhecimento referente a biologia reprodutiva e interações das flores com os polinizadores de espécies da subtribo Cassiinae vem aumentando ao longo do tempo, mas de maneira geral, estudos que busquem entender a funcionalidade da enantioestilia e como são as estreitas relações com seus polinizadores ainda são escassos, assim utilizamos *Senna aversiflora* como modelo floral para nossos experimentos, pois sua morfologia apresenta características complexas relacionadas ao sistema enantioestílico. Principalmente os trabalhos que tratam, com maior detalhamento, dos mecanismos envolvidos no processo de polinização em relação às suas estratégias de deposição e captação de pólen em flores enantioestílicas, bem como em relação à verificação de sinalização floral e dinâmica das interações com as abelhas visitantes. Dessa forma, esta dissertação pretende preencher algumas destas lacunas de conhecimento, estando estruturada em três partes: 1) fundamentação teórica, 2) capítulo 1 que investiga a relação entre dimensões das estruturas reprodutivas com a quantidade de pólen ofertada e verifica o efeito na atração dos polinizadores em *Senna aversiflora* (Herb.) H.S.Irwin & Barneby e 3) capítulo 2 que avalia a variação morfológica em flores de *S. aversiflora* e a influência dela nos locais de deposição e captação de pólen no corpo de diferentes visitantes florais. Assim, nesta dissertação, primeiro procuramos entender os fatores que estão relacionados com a atratividade de flores de pólen, como associam a escolha do polinizador, e depois testamos por meio de simulações, a verificação do ajuste morfológico entre flores e o corpo do polinizador em relação aos locais de deposição e captação de pólen, que propiciem transferência de pólen de forma eficiente (GÓMEZ; ZAMORA, 2006).

## **2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

### **2.1 Enantioestilia**

A enantiostilia é um polimorfismo floral que consiste na apresentação de dois morfos florais em uma mesma espécie que diferem reciprocamente na deflexão do gineceu em relação ao eixo floral (BARRETT, 2002; JESSON; BARRETT, BACKER, 2003). As flores ditas diretas, apresentam o estilete voltado para a direita do eixo central da flor e anteras voltadas para esquerda do eixo central, já as flores ditas esquerdas apresentam estilete voltado para esquerda e anteras voltadas para direita (BARRETT, 2002; JESSON; BARRETT, BACKER, 2003). A enantiostilia pode se expressar em um sistema dimórfico ou monomórfico. No tipo dimórfico, existe apenas um morfotipo floral por indivíduo, ou seja, plantas apenas com flores E e outras plantas apenas com flores D, enquanto o tipo monomórfico apresenta os dois morfotipos florais dentro do mesmo indivíduo (JESSON; BARRETT, 2003; ALMEIDA *et al.*, 2013b; MORAIS *et al.*, 2020). Além disso, a enantiostilia monomórfica pode se expressar de duas formas: na primeira, as inflorescências de um mesmo indivíduo possuem separadamente, apenas flores D e apenas flores E; na segunda forma, uma mesma inflorescência possui ambos os morfotipos florais. A enantiostilia tem sido relatada para cerca de 3% das famílias de angiospermas (VALEJO-MARÍN *et al.*, 2010), sendo o tipo monomórfico mais comum que o tipo dimórfico (JESSON; BARRETT, 2003; BEZERRA, 2008). Até o presente, a enantiostilia ocorre de forma consistente em cerca de 17 famílias que abrangem 11 ordens distintas de angiospermas. Esse fenômeno manifesta-se nas variantes monomórfica e dimórfica. Nas espécies monomórficas, ocorre a produção de flores com os morfos direito e esquerdo no mesmo indivíduo. Já nas espécies dimórficas, os morfos de flores diferentes são encontrados em indivíduos distintos. A ocorrência de enantiostilia dimórfica é documentada apenas em três famílias, as quais estão distribuídas em 2 ordens que são exclusivas das monocotiledôneas.

Estudos em torno da evolução da enantiostilia estimam que o tipo monomórfico surgiu previamente em relação ao dimórfico, ambos de maneira independente (JESSON; BARRETT, 2003). No entanto, os registros de ocorrência de enantiostilia dimórfica se sucederam em famílias nas quais o tipo monomórfico também ocorre. As quais, ambas podem ser interpretadas como formas das plantas reduzirem as taxas relacionadas aos impactos da geitonogamia, principalmente o tipo dimórfico (JESSON; BARRETT, 2003; ALMEIDA *et al.*, 2013a).

## **2.2 Enantiostilia e polinização por vibração em *Senna* Mill.**

Espécies de *Senna* Mill. são tipicamente relatadas como enantiostílicas (CARVALHO; OLIVEIRA, 2003; LAPORTA, 2005; ALMEIDA *et al.*, 2013a), sendo na sua maioria caracterizadas como espécies enantiostílicas monomórficas (WESTERKAMP, 2004; DUTRA, 2009), demonstrando um elevado índice de autocompatibilidade (ALMEIDA *et al.*, 2013a,b;

ALMEIDA *et al.*, 2015), bem como variações morfológicas e interações com visitantes florais (WESTERKAMP, 2004; ALMEIDA *et al.*, 2013a,b; 2015).

Estas espécies caracterizam-se por apresentarem estigma puntiforme (“*point-tipped*”) formando uma câmara rodeada de tricomas, androceu heterântero (estames diferem em funcionalidade e tamanho), anteras tubulares e poricidas, necessitando da ação vibratória desempenhada por seus polinizadores para liberação de pólen, sendo este o único recurso oferecido (MARAZZI *et al.*, 2007; MARAZZI *et al.*, 2008). Dessa forma, espécies de *Senna*, usualmente, apresentam melitofilia sendo polinizadas por abelhas de médio a grande porte, sendo os gêneros *Bombus*, *Centris*, *Melipona* e *Xylocopa* os mais comumente associados as flores de *Senna* por coletar pólen por vibração (“*buzz-pollination*”) (LAPORTA, 2005; ALMEIDA *et al.*, 2013). Além disso, ainda apresentam diferentes estratégias relacionadas a deposição e captação de pólen no momento da polinização, podendo ocorrer de forma direta (DUTRA *et al.*, 2009) e/ou indireta (COSTA *et al.*, 2007). Essa deposição indireta se dá quando outras estruturas da flor estão envolvidas no processo, como o caso de pétalas. Tais pétalas podem promover mecanismos de ricochete e looping que possibilitam a deposição de pólen no dorso dos polinizadores (WESTERKAMP, 2004; ALMEIDA *et al.*, 2013a).

No entanto, o forrageamento pode ser otimizado de acordo com especificidade de encaixe do corpo do visitante na flor, com isso, obtendo recursos de forma mais eficiente (MORAIS *et al.*, 2020). As plantas em sua maioria investem em maior atração visual, nas quais suas características florais demonstram a disponibilidade de recurso oferecido (SALEH *et al.*, 2006). Tais estímulos, são informações que auxiliam no reconhecimento e na interação por parte desses visitantes (KUNZE; GUMBERT, 2001). Esse conjunto de traços florais podem exercer atração ao polinizador, possibilitando uma constância em suas visitas, funcionando também como filtro por parte dos polinizadores.

### 2.3 Dinâmica de deposição e captação de pólen no sistema enantiostílico

Grande parte das características florais tiveram sua origem evolutiva, provavelmente, por mecanismos de seleção natural mediados pelas interações com seus polinizadores em função da aptidão masculina: transferência polínica bem-sucedida para estigmas compatíveis (QUELLER, 1983; STANTON, SNOW; HANDEL, 1986; KUDO, 2003). Estudos demonstraram que a polinização realizada por animais poderia aumentar as taxas de sucesso reprodutivo, limitando a retirada de pólen por polinizadores individuais e partilhando de forma mais equilibrada com os demais visitantes (LLOYD; YATES, 1982; HARDER; THOMSON, 1989; HARDER, 1990; HARDER; BARRETT, 1993; LARSON;

BARRETT, 1999). A morfologia das flores (forma e tamanho), produção de pólen, deiscência e arranjo das anteras influenciam na deposição e distribuição do pólen durante a visita dos polinizadores (HARDER; BARRETT, 1993; HARDER *et al.*, 2001).

A organização das anteras é determinante para deposição do pólen no corpo do polinizador, influenciando diretamente nas taxas de perda de pólen por meio da limpeza (*grooming*; FAEGRI; VAN DER PIJL, 1979; HARDER, 1990; HOLMQUIST *et al.*, 2011). As anteras de plantas hermafroditas, especialmente em espécies com um polimorfismo floral específico como a enantiostilia, devem se organizar de maneira que maximizem a dispersão de pólen com a deposição em partes específicas no corpo do polinizador, a fim de diminuir a perda do recurso e as taxas de geitonogamia (BARRETT; COLE; HARDER, 1998; CRESSWELL *et al.*, 2002; BEZERRA, 2008; KRIEK, 2008). Dessa forma, a especialização da disposição das anteras em flores de morfologia específica tende a dispersar de forma bem-sucedida dos grãos de pólen durante visitas únicas (WOLFE; BARRETT, 1989; KOHN; BARRETT, 1992; CRESSWELL *et al.*, 2002). Entretanto, os efeitos da influência da deposição e captação de pólen por flores que possuem o arranjo de um sistema enantiostílico ainda são pouco relatados.

Além das características já abordadas, a remoção limitada de pólen por visita como estratégia para evitar a autodeposição de pólen ou congestionamento no estigma, ocorre em função do arranjo das anteras (WEBB; LLOYD, 1986; CRESSWELL *et al.*, 2002; BEZERRA, 2008). Em espécies autocompatíveis, o aumento de deposição de pólen de uma mesma origem pode ocasionar a formação de sementes autofecundadas, reduzindo as taxas de germinação das sementes (BARRETT; COLE; HARDER, 1998; HOLMQUIST *et al.*, 2012). Esse acúmulo de um mesmo tipo polínico causando congestionamento no estigma pode diminuir a aptidão masculina e feminina através do número limitado de grãos de pólen e produção de diásporos autogâmicos que acarreta endogamia. Assim, não só a organização das anteras na estrutura floral em relação ao estigma influencia no fluxo polínico de flores enantiostílicas (HARDER; BARRETT, 1993; HARDER *et al.*, 2001; CRESSWELL *et al.*, 2002; HOLMQUIST *et al.*, 2012; ALMEIDA; CASTRO, 2019).

Flores de espécies de *Senna* possuem sete estames, que se distribuem de diferentes formas espacialmente a depender da espécie. No caso de *S. aversiflora* existe um grupo de quatro estames centrais de ápices curtos e retos e outro grupo de três estames centro abaxial de ápices curvos direcionados para a pétala curvada (CORREIA; CONCEIÇÃO, 2017;

SILVA *et al.*, 2018). Esse arranjo de anteras funciona limitando a remoção e atuando na especialização da captação de pólen pelo estigma, a partir do controle mediado pelo ajuste em que as anteras contactam o corpo do polinizador durante o forrageio (JESSON; BARRETT, 2003; AMORIM *et al.*, 2017). Como a quantidade e disponibilidade do recurso influenciam na duração da visita, tanto a deposição como a captação são influenciadas por este mecanismo (LAPORTA, 2005; HOLMQUIST *et al.*, 2012; AMORIM *et al.*, 2017).

#### **2.4 Variação do display floral e influência na dinâmica de visitas**

Os diferentes padrões de ajustes morfológicos e variações entre indivíduos de uma mesma espécie de planta mediado por diferentes agentes polinizadores podem auxiliar na compreensão dos processos de adaptações em função das interações e seleção dos traços florais por esses animais, podendo resultar em divergências morfológicas entre populações (ORDANO *et al.*, 2008; ARMBRUSTER *et al.*, 2009). Desse modo, estudos que busquem a compreensão de como essa variação e distribuição ocorre em espécies distribuídas em diferentes escalas ambientais é um dos primeiros passos determinantes para avaliar a importância dos fatores promotores de diferenciação, que ao longo do tempo pode ser um fator facilitador de especiação (FERREIRO *et al.*, 2017). Assim, esses processos podem ser facilitados dentro de um ecossistema em nível intraespecífico por fatores como a seleção natural exercida pelas interações de fatores bióticos e abióticos, bem como processos aleatórios que podem ocorrer ao acaso, como a deriva gênica (MORÉ *et al.*, 2012).

Dessa forma, considerando a distribuição geográfica de uma determinada espécie vegetal, diferentes padrões fenotípicos podem ser observados, como por exemplo, os mosaicos biogeográficos em uma mesma área ou ambiente (ARMBRUSTER *et al.*, 2009). Assim, variações nas interações polinizador-planta podem ser observadas e determinadas a partir dos padrões de adaptação local das populações e de coevolução de acordo com os diferentes ajustes morfológicos entre os indivíduos que interagem no sistema (ARMBRUSTER *et al.*, 2009; FERREIRO *et al.*, 2017). Estes fatores podem ser correlacionados com a variação seletiva que ocorre em mosaicos geográficos mediados pelos fatores bióticos e abióticos (BARÔNIO *et al.*, 2016).

Espécies que possuem displays florais com maiores exibições podem aumentar significativamente as taxas de atração de polinizadores em relação a indivíduos com poucas ou diminutas flores (KLINKHAMER; DE JONG, 1990; MITCHELL, 1994; GALLOWAY; CRIGLIANO; GREMSKI, 2002). Uma vez que uma planta possui flores maiores, os visitantes que se aproximarem provavelmente farão sondagem em sequência dessas flores (BARRETT *et*

*al.*, 1994; OHARA; HIGASHI, 1994; HARDER; BARRETT, 1995; GOULSON *et al.*, 1998; VRIELING *et al.*, 1999), mas podem sondar uma proporção de flores em ordem decrescente de tamanho para avaliação e obtenção de recurso (KLINKHAMER *et al.*, 1989; ROBERTSON, 1992; HARDER; BARRETT, 1995; MITCHELL *et al.*, 2004). O resultado da compensação da relação entre disponibilidade e disposição de flores maiores e menores, é que as taxas de visitação podem não ser afetadas pela exibição floral (ROBERTSON; MCNAIR, 1995; GOULSON *et al.*, 1998; VRIELING *et al.*, 1999).

A mudança dos padrões no forrageamento dos polinizadores em função da variação do tamanho dos displays pode exercer efeitos positivos na reprodução das plantas (HARDER; BARRETT, 1995; MITCHELL *et al.*, 2004). A medida que o tamanho da exibição floral aumenta, acarreta uma tendência de sequenciamento de visitação dos polinizadores em flores de uma única planta, podendo acarretar a ocorrência de geitonogamia (DUDASH, 1991; DE JONG *et al.*, 1993; HARDER; BARRETT, 1995; SNOW *et al.*, 1996). Além disso, a resposta dos polinizadores a variação no display floral ocasiona também mudanças nas distâncias de vôo dos polinizadores (PYKE, 1978; OHASHI; YAHARA, 1998), que pode influenciar na taxa de reprodução das plantas (KARRON *et al.*, 1995).

A maioria dos estudos que abordam a resposta dos polinizadores em relação à exibição de displays florais não distingue esse comportamento de visitas sequenciais entre táxons desses animais no que concerne às respostas específicas em plantas que exibem variações no tamanho das exibições dos displays florais (PETTERSSON, 1991; HARDER; BARRETT, 1995; GOULSON *et al.*, 1998; MITCHELL *et al.*, 2004). Assim, o modo de forrageamento podem variar de acordo com a exibição do display floral e assim, essas interações entre flores e seus polinizadores podem ser em consequência de respostas ecológicas e coevolutivas importantes, como as mudanças nos padrões de reprodução e seleção de características florais (PETTERSSON, 1991; WILSON; THOMSON, 1991; BENITEZ-VIEYRA *et al.*, 2006).

Adaptações morfológicas de flores aos polinizadores têm sido tratadas como fator importante para explicação de fatores de diversidade e evolução floral. As evidências remontam desde as primeiras hipóteses de Darwin (1877) e corroboradas por Nilsson (1983), estudando a seleção de escolha floral baseada na exibição do display floral por polinizadores de diferentes táxons (JOHNSON; STEINER, 1997). Além disso, estudos demonstraram que traços florais estão em constante seleção devido às respostas ao ambiente e interações com seus visitantes (KINGSOLVER *et al.*, 2001; BENITEZ-VIEYRA *et al.*, 2006). Entende-se que as morfologias das flores são adaptadas ao comportamento dos polinizadores, garantindo dessa maneira, a atração e por consequência o contato dos polinizadores com seus órgãos reprodutivos no

momento da interação, sendo alcançado pelo ajuste funcional entre polinizador-flor (FENSTER *et al.*, 2004; MITCHELL *et al.*, 2004; BENITEZ-VIEYRA *et al.*, 2006). Grande parte dos estudos observam características gerais das flores, como número, disposição, tamanho e diferenças de altura no indivíduo, características que são atraentes para os visitantes florais (polinizadores ou não) ou em estruturas que são associadas aos sistemas reprodutivos (FENSTER *et al.*, 2004; VAUGHTON; RAMSEY, 2010; VOS *et al.*, 2012; SLETVOLD; TYE; AGREN, 2016; TRUNSCHKE; SLETVOLD; AGREN, 2017; LIEBMAN *et al.*, 2018).

Plantas com especialização dos traços florais, na maioria das vezes, experimentam os efeitos de seleção natural (JOHNSON; STEINER, 1997, 2000; VAUGHTON; RAMSEY, 2010; SLETVOLD; TYE; AGREN, 2016; AGREN, 2017), principalmente no que se refere à semelhança nos traços florais em relação às estruturas de pouso e recolhimento de recurso dos polinizadores (NILSSON, 1988; HERRERA, 1993, MAAD, 2000; MAAD; ALEXANDERSSON, 2004; AGREN, 2017; LIEBMAN *et al.*, 2018). É esperado que características ligadas a disponibilidade de recursos e estruturas de fixação utilizadas pelas abelhas nas flores sejam direcionais (RAMSEY, 2010; VOS *et al.*, 2012; SLETVOLD; TYE; AGREN, 2016; TRUNSCHKE; SLETVOLD; AGREN, 2017) ou estabilizadoras do processo de seleção (CRESSWELL, 1998; FUTUYMA, 2005).

Esses processos de seleção favorecem combinações de alguns estados de caracteres em função de outras, que geralmente se dão por caracteres funcionalmente relacionados (SINERVO; SVENSSON, 2002; FUTUYMA, 2005). Estudos que abordam essas correlações de características florais com padrões de integração com seus visitantes fornecem evidências empíricas no que concerne às interações baseadas em atratividade de displays e padrões de forrageamento (ARMBRUSTER *et al.*, 1999, 2000; CARUSO, 2000; HERRERA, 2001; MITCHELL *et al.*, 2004; BENITEZ-VIEYRA *et al.*, 2006; SLETVOLD; GRINDELAND; AGREN, 2010; SUN *et al.*, 2018). Porém, para alguns sistemas florais, como a enantiostilia, que ocorre em espécies de *Senna*, essas relações ainda carecem de estudos específicos sobre os padrões coevolutivos.

## 2.5 Sinalização floral e seleção mediada por polinizadores

A sinalização emitida pelas flores para seus polinizadores anuncia recompensas e, em troca, os polinizadores favorecem a transferência de grãos de pólen direcionada entre indivíduos da mesma espécie (SCHIESTL; JOHNSON, 2013). Como as flores costumam esconder as recompensas, os polinizadores necessitam da sinalização floral para orientação e direcionamento, como coloração, tamanho do display e odor para a escolha no momento da

visitação. Estes sinais correlacionam-se com as recompensas e, para tanto, são considerados honestos quando beneficiam os polinizadores, direcionando-os para flores recompensadoras (HOWELL; ALARCON, 2007; KNAUER; KOKKO; SCHIESTL, 2021).

Ainda que a sinalização honesta entre flores de um indivíduo (como mudança de sinais nas flores com menor recompensa após a polinização) possa beneficiar a planta e também o direcionamento dos polinizadores para flores específicas, estes podem aumentar os níveis de atração entre planta-polinizador (BENITEZ-VIEYRA *et al.*, 2006; BRITO *et al.*, 2015; MAKINO; OHASHI, 2017). Assim, a sinalização honesta dos indivíduos dentro de uma população ainda é complexa e difícil de explicar (SCHAEFER *et al.*, 2004; BRITO *et al.*, 2015). Por outro lado, indivíduos menos vigorosos que produzem poucas flores e baixa recompensa, podem usar mecanismos de trapaça, podendo investir em uma maior sinalização de suas flores, o que pode refletir no aumento das taxas de visitação, especialmente, se o recurso para ser produzido tiver alto custo energético, assim, esse mecanismo de trapaça pode ser vantajoso para a planta.

A aparente tentação de trapaceio, faz com que muitas espécies de plantas exibam sinais florais honestos que se relacionam positivamente com as quantidades de recursos produzidos (ARMBRUSTER *et al.*, 2005; GÓMEZ *et al.*, 2008; SANDRING; AGREN, 2009; KNAUER; KOKKO; SCHIESTL, 2021). A honestidade mediada pelas flores para seus polinizadores, pode ser mantida por diferentes mecanismos, tais como: (a) sinais podem ser convertidos em índices, quando estão intrinsecamente relacionados à qualidade da sinalização, reduzindo as taxas de trapaça (sem recompensa floral) e desonestidade (sinalização não relacionadas às recompensas); (b) a honestidade pode ser um mecanismo estável quando os indivíduos não lucram com desvios dessa função para se beneficiarem (mecanismos de trapaça) (COHEN; SHMIDA, 1993; BELSARE *et al.*, 2009; SLETVOLD; GRINDELAND; AGREN, 2010; SUN *et al.*, 2018). Com isso, é esperado que esse mecanismo se desenvolva em indivíduos menos vigorosos que experimentam custos mais altos e pouco benefício para emitirem alto sinal em relação a indivíduos vigorosos dentro da população, que os impede de trapacear (GROSE, 2011; KULBABA; WORLEY, 2012; HIGHAM, 2014).

A sinalização floral dentro de uma população pode ser estável, como demonstrado em modelagem proposta por Cohen e Shmida (1993) e corroborado por Knauer, Kokko e Schiestl (2021), os quais elegeram quatro condições a serem atendidas pelo mecanismo: (a) a variação de recurso disponibilizado pelas flores devido a diferentes taxas de alocação de recursos totais para as inflorescências entre os indivíduos de uma mesma população, (b) limitação dos recursos disponíveis para a sinalização e para o recurso destinados a outros órgãos (como inflorescências

e frutos) refletindo em um trade-off entre esses fatores (esses mecanismos podem não ser produzidos simultaneamente, pois a alocação de recurso para um limita o outro), (c) seleção floral mediada por polinizadores a partir da sinalização floral e (d) seleção mediada por polinizadores baseada na recompensa disponibilizada pela flor (ARMBRUSTER *et al.*, 2005; SLETVOLD; GRINDELAND; AGREN, 2010; SUN *et al.*, 2018). Dessa maneira, apesar dos trade-offs estabelecidos entre sinal e recompensas, essas características tendem a se correlacionarem positivamente à medida que ocorre otimização de aptidão entre planta-polinizador, causando correlações positivas entre planta-polinizador (PYKE, 1991; ORDANO; ORNELAS, 2005; VASCONCELOS; PROENÇA, 2015; KNAUER; KOKKO; SCHIESTL, 2021).

Sinalização e produção de pólen levam a custos fisiológicos (ORDANO; ORNELAS, 2005; VASCONCELOS; PROENÇA, 2015) ou ecológicos para plantas, como o aumento da atratividade para herbívoros (KESSLER *et al.*, 2015; KNAUER; SCHIESTL, 2017; RAMOS CASTRO; SCHIESTL, 2020), bem como podem ser selecionadas pela mediação da interação com o polinizador (SANDRING; AGREN, 2009; SLETVOLD *et al.*, 2010; KULBABA; WORLEY, 2012). Quando um polinizador chega a uma inflorescência ou um conjunto de flores, à medida que busca e consome recursos, pode avaliar as flores de acordo com as recompensas florais e ajustar o comportamento de forrageio. Assim, a revisitação em uma planta, o número de flores e o tempo dedicado a sondagem das flores são ajustados, beneficiando tanto o visitante como a economia dos recursos florais alocados pelas plantas (GALEN; PLOWRIGHT, 1985; MITCHELL, 1993; KADMON; SHMIDA, 1992; MAKINO; SAKAI, 2007; CRESSWELL, 1999; BRANDENBURG *et al.*, 2012).

Grande exibição de atratividade floral, em contraste com o aumento da ação de herbívoros, pode beneficiar ainda mais as plantas pelo aumento do fluxo de polinizadores, ultrapassando taxas de perda por herbivoria (ARMBRUSTER *et al.*, 2005; BYERS *et al.*, 2014; GERVASI; SCHIESTL, 2017; RAMOS CASTRO; SCHIESTL, 2020). A preferência inata ou aprendida pelos polinizadores a partir da indução e interação com certos sinais exibidos pelas plantas é relevante para polinizadores generalistas que possuem hábito de forrageamento generalista em diferentes grupos de espécies que exibem diferentes sinais (SANDRING; AGREN, 2009; SLETVOLD *et al.*, 2010; KNAUER; KOKKO; SCHIESTL, 2021). Ensaios realizados em ambientes controlados mostram a aptidão de zangões em aprender a distinguir entre sinais honestos e desonestos e desenvolvem preferências por sinais florais honestos em um curto período de tempo (KNAUER; SCHIESTL, 2014; BURDON *et al.*, 2020). Entretanto ainda não se tem registros sobre as capacidades de aprendizagem semelhantes em ambientes

naturais com diferentes espécies de plantas e características de sinalização (LEONARD; FRANCIS, 2017).

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, N. M.; CASTRO, C. C.; LEITE, A. V.; NOVO, R. R.; MACHADO, I. C. Enantiostyly in *Chamaecrista ramosa* (Fabaceae-Caesalpinioideae): floral morphology, pollen transfer dynamics and breeding system. **Plant Biology**, v. 15, p. 369-375, 2013a.
- ALMEIDA, N. M.; CASTRO, C. C.; LEITE, A. V.; NOVO, R. R.; MACHADO, I. C. Floral polymorphism in *Chamaecrista flexuosa* (Fabaceae-Caesalpinioideae): a possible case of atypical enantiostyly?. **Annals of Botany**, v. 112, n. 6, p. 1117-1123, 2013b.
- ALMEIDA, N. M.; BEZERRA, T. T.; OLIVEIRA, C. R. S.; NOVO, R. R.; SIQUEIRA-FILHO, J. A.; OLIVEIRA, P. E.; CASTRO, C. C. Breeding systems of enantiostylous Cassiinae species (Fabaceae, Caesalpinioideae). **Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 215, p. 9-15, 2015.
- ALMEIDA, N. M.; SOUZA, J. T.; OLIVEIRA, C. R. S.; BEZERRA, T. T.; NOVO, R. R.; SIQUEIRA-FILHO, J. A.; OLIVEIRA, P. E.; CASTRO, C. C. Functional dimorphic enantiostyly in monomorphic enantiostylous species of the subtribe *Cassiinae* (Fabaceae-Caesalpinioideae). **Plant Biology**, v. 20, p. 797–801, 2018.
- ALMEIDA, N. M.; CASTRO, C. C. **Enantiostyly in Angiosperms**. In: BAHADUR, B., *et al.*, eds. *Asymmetry in Plants: Biology of Handedness*, p. 319-329, 2019.
- AMORIM, T.; MARAZZI, B.; SOARES, A. A.; FORNI-MARTINS, E. R.; MUNIZ, C. R.; WESTERKAMP, C. Ricochet pollination in *Senna* (Fabaceae) - petals deflect pollen jets and promote division of labour among flower structures. **Plant Biology**, v. 19, n. 6, p. 951-962, 2017.
- APG IV. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. **Botanical Journal of the Linnean Society**. v.181. p. 1–20. 2016.
- ARMBRUSTER, W. S.; DI STILIO, V. S.; TUXILL, J. D.; FLORES, T. C.; VELÁSQUEZ RUNK, J.L. Covariance and decoupling of floral and vegetative traits in nine neotropical plants: a re-evaluation of Berg's correlation–pleiades concept. **American Journal of Botany**, v.86, p. 39-55, 1999.
- ARMBRUSTER, W. S.; PÉLABON, C.; HANSEN, T. F.; MULDER, C. P. H. Floral integration, modularity, and accuracy. *Phenotypic Integration* (eds M. Pigliucci & K. Preston), pp. 23–49. Oxford University Press, Oxford, UK, 2000.
- ARMBRUSTER, W. S.; ANTONSEN, L.; PELABON, C. Phenotypic selection on *Dalechampia blossoms*: Honest signaling affects pollination success. **Ecology**, v. 86, n. 12, p.3323-3333, 2005.
- BAHADUR, B.; CHATUVERDI, A.; RAMA-SWARY, N. S. E. M. Studies of pollen in relation to enantiostyly and heteranthery in *Cassia* (Caesalpinaceae). **Current perspectives in Palynology Research. Journal of Palynology**, p. 7-22, 1990.

BENITEZ-VIEYRA, S.; MEDINA, A. M.; GLINOS, E.; COCUCCHI, A. A. Pollinator-mediated selection on floral traits and size of floral display in *Cyclopogon elatus*, a sweat bee-pollinated orchid. **Functional Ecology**, v. 20, n. 6, p. 948-957, 2006.

BARRETT, S. C. H.; COLE, W.W.; HARDER, L. D. Experimental studies on the effects of floral design and display on plant mating. **Reproductive Biology in Systematics**, Conservation and Economic Botany (eds S.J. Owens & P.J. Rudall), pp. 1– 13. Royal Botanic Gardens, Kew, UK. 1998.

BARRETT, S. C. H.; JESSON, L. K.; BAKER, A. M. The evolution and function of stylar polymorphisms in flowering plants. **Annals of Botany**, v. 85, p. 253–265, 2000.

BARRETT, S. C. H.; HARDER, L. D.; COLE, W.W. Effects of flower number and position on self-fertilization in experimental populations of *Eichhornia paniculata* (Pontederiaceae). **Functional Ecology**, v. 8, p. 526– 535, 1994.

BARRETT, S. C. H. The evolution of plant sexual diversity. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, p. 274–284, 2002.

BELSARE, P. V.; SRIRAM, B.; WATVE, M. G. The co-optimization of floral display and nectar reward. **Journal of Biosciences**, v. 34, n. 6, p. 963– 967, 2009.

BENITEZ-VIEYRA, S.; MEDINA, A. M.; GLINOS, E.; COCUCCHI, A. A. Pollinator-mediated selection on floral traits and size of floral display in *Cyclopogon elatus*, a sweat bee-pollinated orchid. **Functional Ecology**, v. 20, n. 6, p. 948– 957, 2006.

BEZERRA, E.L.S. **Gilda de flores de óleo do Parque Nacional do Catimbau: fenologia, polinização e sistema reprodutivo**. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2008.

BRANDENBURG, A.; KUHLEMEIER, C.; BSHARY, R. Hawkmoth pollinators decrease seed set of a low-nectar *Petunia axillaris* line through reduced probing time. **Current Biology**, v. 22, n. 17, p. 1635– 1639, 2012.

BRITO, V. L.; WEYNANS, K.; SAZIMA, M.; LUNAU, K. 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**, v. 6, p. 362, 2015.

BURDON, R. C.; RAGUSO, R. A.; GEGEAR, R. J.; PIERCE, E. C.; KESSLER, A.; PARACHNOWITSCH, A. L. Scented nectar and the challenge of measuring honest signals in pollination. **Journal of Ecology**, v. 108, n. 5, p. 2132– 2144, 2020.

BYERS, K.; BRADSHAW, H. D.; RIFFELL, J. A. Three floral volatiles contribute to differential pollinator attraction in monkeyflowers (*Mimulus*). **Journal of Experimental Biology**, v. 217, n. 4, p. 614– 623, 2014.

CARUSO, C. M. Competition for pollination influences selection on floral traits of *Ipomopsis aggregata*. **Evolution**, v. 54, p. 1546-1557, 2000.

CARVALHO, D. A.; OLIVEIRA, P. E. Biologia reprodutiva e polinização de *Senna sylvestris* (Vell.) (Leguminosae-Caesalpinioideae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, p. 319–328, 2003.

COHEN, D.; SHMIDA, A. The evolution of flower display and reward. **Evolutionary Biology**, v. 27, p. 197-243, 1993.

CORREIA, C. L. S. B.; CONCEIÇÃO, A. S. The genus *Senna* Mill. (Leguminosae: Caesalpinioideae) in a fragment of the Ecological Station Raso da Catarina, Bahia, Brazil. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 39, p. 357-372, 2017.

COSTA, C.B.N.; LAMBERT, S.M.; BORBA, E.L. & DE QUEIROZ, L.P. Postzygotic reproductive isolation between sympatric taxa in the *Chamaecrista desvauxii* complex (Leguminosae-Caesalpinioideae). **Annals of Botany**, v. 99, p.625–635, 2007.

CRESSWELL, J. E. Stabilizing selection and the structural variability of flowers within species. **Annals of Botany**, v. 81, p. 463– 473, 1998.

CRESSWELL, J. E. The influence of nectar and pollen availability on pollen transfer by individual flowers of oil-seed rape (*Brassica napus*) when pollinated by bumblebees (*Bombus lapidarius*). **Journal of Ecology**, v. 87, n. 4, p. 670– 677, 1999.

CRESSWELL J. E.; OSBORNE J. L.; BELL S. A. A model of pollinator-mediated gene flow between plant populations with numerical solutions for bumblebees pollinating oilseed rape. **Oikos**, v. 98, p. 375–384, 2002.

DARWIN, C. (1877) The various contrivances by which British and foreign orchids are fertilized by insects . D. Appleton, Nova York.

DE JONG, T. J.; WASER, N. M.; KLINKHAMER, P. G. L. Geitonogamy – the neglected side of selfing. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 8, p. 321– 325, 1993.

DUDASH, M. R. Plant size effects on female and male function in hermaphroditic *Sabatia angularis* (Gentianaceae). **Ecology**, v. 72, p. 1004– 1012, 1991.

DULBERGER, R. The floral biology of *Cassia didymobotrya* and *C. auriculata* (Caesalpinaceae). **American Journal of Botany**, v. 68, p. 1350–1360, 1981.

DUTRA, V. F.; VIEIRA, M. F.; GARCIA, F. C. P.; LIMA, H. C. Fenologia reprodutiva, síndromes de polinização e dispersão em espécies de Leguminosae dos campos rupestres do Parque Estadual do Itacolomi, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia**, v. 60, n. 2, p. 371-387, 2009.

ELTZ, T. Tracing pollinator footprints on natural flowers. **Journal of Chemical Ecology**, v. 32, p. 907-915, 2006.

FAEGRI, K.; VAN DER PIJL, E. L. **The principles of pollination ecology**. Pergamon Press. Oxford, 1979.

FENSTER, C. B. Mirror image and their effect on outcrossing rate in *Chamaecrista fasciculata* (Leguminosae). **American Journal of Botany**, v. 82, p. 46–50, 1995.

FUTUYMA, D. J. **Evolution**. Sinauer Associados. Sunderland, MA, EUA, 2005.

GALLOWAY, L. F.; CRIGLIANO, T.; GREMSKI, K. The contribution of display size and dichogamy to potential geitonogamy in *Campanula americana*. **International Journal of Plant Science**, v. 163, p. 133-139, 2002.

GALEN, C.; PLOWRIGHT, R. C. The effects of nectar level and flower development on pollen carry-over in inflorescences of fireweed (*Epilobium angustifolium*) (Onagraceae). **Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique**, v. 63, n. 3, p. 488- 491, 1985.

GEGEAR, R. J.; LAVERTY, T. M. The effect of variation among floral traits on the flower constancy of pollinators. **Cognitive ecology of pollination: Animal Behavior and Floral Evolution**, 2001.

GERVASI, D. D. L.; SCHIESTL, F. P. Real-time divergent evolution in plants driven by pollinators. **Nature Communications**, v. 8, p. 14691, 2017.

GÓMEZ, J. M.; BOSCH, J.; PERFECTTI, F.; FERNANDEZ, J. D.; ABDELAZIZ, M.; CAMACHO, J. P. M. Association between floral traits and rewards in *Erysimum mediohispanicum* (Brassicaceae). **Annals of Botany**, v. 101, n. 9, p. 1413– 1420, 2008.

GOULSON, D.; STOUT, J.C.; HAWSON, S.A.; ALLEN, J. A. Floral display size in comfrey, *Symphytum officinale* L. (Boraginaceae): relationships with visitation by three bumblebee species and subsequent seed set. **Oecologia**, v. 113, p. 502– 508, 1998.

GOULSON, D. Foraging strategies of insects for gathering nectar and pollen, and implications for plant ecology and evolution. **Perspectives in plant ecology, evolution and systematics**, v. 2, n. 2, p. 185-209, 1999.

GOTTSBERGER, G. Some pollination strategies in Neotropical savanas and forests. **Plant Systematics and Evolution**, v. 152, p. 29-45, 1986.

GROSE, J. Modelling and the fall and rise of the handicap principle. **Biology & Philosophy**, v. 26, n. 5, p. 677– 696, 2011.

HARDER, L. D. Pollen removal by bumble bees and its implications for pollen dispersal. **Ecology**, v. 71, p. 1110– 1125, 1990.

HARDER, L. D.; BARRETT, S. C. H. Pollen removal from tristylous *Pontederia cordata*: effects of anther position and pollinator specialization. **Ecology**, v. 74, p. 1059– 1072, 1993.

HARDER, L. D.; BARRETT, S. C. H. Mating cost of large floral displays in hermaphrodite plants. **Nature**, v. 373, p. 512– 515, 1995.

HARDER, L. D.; THOMSON, J. D. Evolutionary options for maximizing pollen dispersal of animal-pollinated plants. **American Naturalist**, v. 133, p. 323– 372, 1989.

HARDER, L. D.; WILLIAMS, N. M.; JORDAN, C. Y.; NELSON, W. A. The effects of floral design and display on pollinator economics and pollen dispersal. **Cognitive Ecology of Pollination** (eds L. Chittka & J.D. Thomson), pp. 297– 317. Cambridge University Press, Cambridge, 2001.

HERRERA, C. M. Deconstructing a floral phenotype: do pollinators select for corolla integration in *Lavandula latifolia*?. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 14, p. 574-584, 2001.

HIGHAM, J. P. How does honest costly signaling work?. **Behavioral Ecology**, v. 25, n. 1, p. 8– 11, 2014.

HOLMQUIST, K. G.; MITCHELL, R. J.; KARRON, J. D. Influence of pollinator grooming on pollen-mediated gene dispersal in *Mimulus ringens* (Phrymaceae). **Plant Species Biology**, v. 27, n. 1, p. 77–85, 2011.

HOWELL, A. D.; ALARCON, R. *Osmia* bees (Hymenoptera: Megachilidae) can detect nectar-rewarding flowers using olfactory cues. **Animal Behaviour**, v. 74, p. 199–205, 2007.

IRWIN, H. S.; BARNEBY, R. C. Notes on the generic of *Chamaecrista* Moench (Leguminosae: Caesapinioideae). **Brittonia**, v. 28, p. 28–36, 1976.

IRWIN, R. E.; STRAUSS, S. Y. Flower color microevolution in wild radish: Evolutionary response to pollinator-mediated selection. **American Naturalist**, v. 165, p. 225–237, 2005.

JESSON, L. K.; BARRETT, S. C. H. The comparative biology of mirror-image flowers. **International Journal of Sciences**, v. 164, (5 Suppl.), p. 237–249, 2003.

JESSON, L. K.; BARRETT, S. C. H.; DAY, T. A theoretical investigation of the evolution and maintenance of mirror image flowers. **American Naturalist**, v.161, p. 916–930, 2003.

JOHNSON, S. D.; STEINER, K. E. Long-tongued fly pollination and evolution of floral spur length in the *Disa draconis* complex (Orchidaceae). *Evolução*, v. 37, p. 1564–1571, 1997.

KADMON, R.; SHMIDA, A. Departure rules used by bees foraging for nectar – A field-test. **Evolutionary Ecology**, v. 6, n. 2, p. 142–151, 1992.

KARRON, J. D.; TUCKER, R.; THUMSER, N. N.; REINARTZ, J. A. Comparison of pollinator flight movements and gene dispersal patterns in *Mimulus ringens*. *Heredity*, 75, 612–617.

KESSLER, D.; KALLENBACH, M.; DIEZEL, C.; ROTHE, E.; MURDOCK, M.; BALDWIN, I. T. How scent and nectar influence floral antagonists and mutualists. **Elife**, v. 4, p. 07641, p. 2015.

KLINKHAMER, P. G. L.; DE JONG, T. J. Effects of plant size, plant density and sex differential nectar reward on pollinator visitation in the protandrous *Echium vulgare* (Boraginaceae). *Oikos*, v. 57, p. 399–403, 1990.

KLINKHAMER, P. G. L.; DE JONG, T. J.; DE BRUYN, G. L. Plant size and pollinator visitation in *Cynoglossum officinale*. **Oikos**, v. 54, p. 201–204, 1989.

KNAUER, A. C.; SCHIESTL, F. P. Bees use honest floral signals as indicators of reward when visiting flowers. **Ecology Letters**, v. 18, n. 2, p. 135–143, 2014.

KNAUER, A. C.; SCHIESTL, F. P. The effect of pollinators and herbivores on selection for floral signals: A case study in *Brassica rapa*. **Evolutionary Ecology**, v. 31, n. 2, p. 285–304, 2016.

KNAUER, A. C.; KOKKO, H.; SCHIESTL, F. P. **Data from:** Pollinator behaviour and resource limitation maintain honest floral signalling. Digital Repository of the University of Zürich, 2021.

- KULBABA, M. W.; WORLEY, A. C. Selection on floral design in *Polemonium brandegeei* (Polemoniaceae): Female and male fitness under hawkmoth pollination. **Evolution: International Journal of Organic Evolution**, v. 66, n. 5, p. 1344–1359, 2012.
- KUDO, G. Anther arrangement influences pollen deposition and removal in hermaphrodite flowers. **Functional Ecology**, v. 17, n. 3, p. 349 – 355, 2003.
- KUNZE, J.; GUMBERT, A. The combined effect of colour and odor on flower choice behavior of bumble bees in flower mimicry systems. **Behavioral Ecology**, v. 12, p. 447-456, 2001.
- LARSON, B. M. H.; BARRETT, S. C. H. The ecology of pollen limitation in buzz-pollinated *Rhexia virginica* (Melastomataceae). **Journal of Ecology**, v. 87, n. 3, p. 371–381, 1999.
- LAPORTA, C. Floral biology and reproductive system of enantiostylous *Senna corymbosa* (Caesalpinaceae). **Revista de Biologia Tropical**, v. 53, n. 1-2, p. 49-61, 2005.
- LEEGE, L. M.; WOLFE, L.M. Do floral herbivores respond to variation in flower characteristics in *Gelsemium sempervirens* (Loganiaceae), a distylous vine?. **American Journal of Botany**, v. 89, p. 1270-1274, 2002.
- LEIBMAN, L.; ROWE, A.; KOSKI, M. H.; GALLOWAY, L. F. Populations with greater flexibility in floral traits modify mating system in response to the pollinator environment. **Functional Ecology**, v. 32, n. 6, p. 1457–1466, 2018.
- LEONARD, A. S.; FRANCIS, J. S. Plant–animal communication: Past, present and future. **Evolutionary Ecology**, v. 31, n. 2, p. 143-151, 2017.
- LLOYD, D. G.; YATES, J. M. A. Intra-sexual selection and the segregation of pollen and stigmas in hermaphrodite plants, exemplified by *Wahlenbergia albomarginata* (Campanulaceae). **Evolution**, v. 36, p. 903-916, 1982.
- LLOYD, D. G.; WEBB, C. J. The evolution of heterostyly. *In: Evolution and function of heterostyly*. BARRETT, S. C. H (org.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, p. 151-178, 1992.
- LWPG - Leguminosae Working Group Phylogeny. A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. **TAXON**. v. 66, p. 44-77, 2017.
- MAKINO, T. T.; SAKAI, S. Experience changes pollinator responses to floral display size: From size-based to reward-based foraging. **Functional Ecology**, v. 21, n. 5, p. 854- 863, 2007.
- MAKINO, T. T.; OHASHI, K. Honest signals to maintain a long-lasting relationship: Floral colour change prevents plant-level avoidance by experienced pollinators. **Functional Ecology**, v. 31, n. 4, p. 831-837, 2017.
- MARAZZI, B.; ENDRESS, P. K.; QUEIROZ, L. P.; CONTI, E. Phylogenetic relationships within *Senna* (Leguminosae, Cassiinae) based on three chloroplast regions: patterns in the evolution of floral symmetry and extrafloral nectaries. **American Journal of Botany**, v. 93, p. 288-303, 2006.
- MARAZZI, B; ENDRESS, P.K. Patterns and development of floral asymmetry in *Senna* (Leguminosae, Cassiinae). *American Journal of Botany*, v. 95, p. 22-40, 2008.

- MITCHELL, R. J. Adaptive significance of *Ipomopsis aggregata* nectar production – Observation and experiment in the field. **Evolution**, v. 47, n. 1, p. 25-35, 1993.
- MITCHELL, R. J. Effects of floral traits, pollinator visitation, and plant size on *Ipomopsis aggregata* fruit production. **American Naturalist**, v. 143, p. 870-889, 1994.
- MITCHELL, R. J.; KARRON, J. D.; HOLMQUIST, K. G.; BELL, J. M. The influence of *Mimulus ringens* floral display size on pollinator visitation patterns. **Functional Ecology**, v. 18, n. 1, p. 116-124, 2004.
- MORAIS, J. M.; CONSOLARO, H. N.; BERGAMINI, L. L.; FERRERO, V. Patterns of pollen flow in monomorphic Enantiostylous species: the importance of floral morphology and pollinators' size. **Plant Systematics and Evolutions**, v. 306, n. 22, p. 1-12, 2020.
- NILSSON, L. A. Processes of isolation and introgressive interplay between *Platanthera bifolia* (L.) Rich and *P. chlorantha* (Custer) Reichb. (Orchidaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 87, p. 325-350, 1983.
- OHARA, M.; HIGASHI, S. Effects of inflorescence size on visits from pollinators and seed set of *Corydalis ambigua* (Papaveraceae). **Oecologia**, v. 98, p. 25-30, p.1994.
- OHASHI, K.; YAHARA, T. Effects of variation in flower number on pollinator visits in *Cirsium purpuratum* (Asteraceae). **American Journal of Botany**, v. 85, p. 219-224, 1998.
- ORDANO, M.; ORNELAS, J. F. The cost of nectar replenishment in two epiphytic bromeliads. **Journal of Tropical Ecology**, v. 21, n. 5, p. 541-547, 2005.
- PALMER, A. R. What determines direction of asymmetry: genes, environment or chance? **Philosophical Transactions**, v. 371, p. 1-16, 2016.
- PETTERSSON, M. Pollination by a guild of fluctuating moth populations: option for unspecialization in *Silene vulgaris*. **Journal of Ecology**, v. 79, p. 591-604, 1991.
- PINHEIRO, F. Polinização por engodo. In: RECH, A. R., *et al.* (Org.). **Biologia da Polinização**. Rio de Janeiro: Projeto Cultural, p. 327-344, 2014.
- PYKE, G. H. Optimal foraging in bumblebees and coevolution with their plants. **Oecologia**, v. 36, p. 281– 293, 1978.
- PYKE, G. H. What does it cost a plant to produce nectar? **Nature**, v. 350, n. 6313, p. 58-59, 1991.
- QUELLER, D.C. Sexual selection in a hermaphroditic plant. **Nature**, v. 305, p. 706-707, 1983.
- RAMOS CASTRO, S. E.; SCHIESTL, F. P. Evolution of floral fragrance is compromised by herbivory. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 8, p. 30, 2020.
- REAL, L. A.; RATHCKE, B. J. Individual variation in nectar production and its effect on fitness in *Kalmia latifolia*. **Ecology**, v. 72, n. 1, p. 149– 155, 1991.
- RICKLEFS R.; RELYEA, R. **A Economia da Natureza**. 7. ed. Guanabara Koogan, 2016. 636p.

ROBERTSON, A. W. The relationship between floral display size, pollen carryover and geitonogamy in *Myosotis colensoi* (Kirk) Macbride (Boraginaceae). **Biology Journal of the Linnean Society**, v. 46, p. 333-349, 1992.

ROBERTSON, A. W.; MACNAIR, M. R. The effects of floral display size on pollinator service to individual flowers of *Myosotis* and *Mimulus*. **Oikos**, v. 72, p.106– 114, 1995.

SALEH, N.; OHASHI, K.; THOMSON, J. D.; CHITTKA, L. Facultative use of the repellent scent mark in foraging bumblebees: complex versus simple flowers. **Animal Behavior**, v. 71, p. 847-854, 2006.

SANDRING, S.; AGREN, J. Pollinator-mediated selection on floral display and flowering time in the perennial herb *Arabidopsis lyrata*. **Evolution**, v. 63, n. 5, p. 1292– 1300, 2009.

SCHAEFER, H. M., SCHAEFER, V.; LEVEY, D. J. How plant-animal interactions signal new insights in communication. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 19, n. 11, p. 577– 584, 2004.

SCHIESTL, F. P.; JOHNSON, S. D. Pollinator-mediated evolution of floral signals. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 28, n. 5, p. 307-315, 2013.

SILVA, M. J.; SANTOS, J. P.; SOUZA, A. O. Sinopse taxonômica do gênero *Senna* (Leguminosae, Caesalpinioideae, Cassieae) na Região Centro-Oeste do Brasil. **Rodriguésia**, v. 69, n. 2, p. 733-763, 2018.

SINERVO, B.; SVENSSON, E. Correlational selection and the evolution of genomic architecture. **Heredity**, v. 89, p. 329-338, 2002.

SLETVOLD, N.; GRINDELAND, J. M.; AGREN, J. Pollinator-mediated selection on floral display, spur length and flowering phenology in the deceptive orchid *Dactylorhiza lapponica*. **New Phytologist**, v. 188, n. 2, p. 385-392, 2010.

SLETVOLD, N.; TYE, M.; ÅGREN, J. Resource- and pollinator-mediated selection on floral traits. **Functional Ecology**, v. 31, n. 1, p. 135–141, 2016.

SNOW, A. A.; SPIRA, T. P.; SIMPSON, R.; KLIPS, R. A. **The ecology of geitonogamous pollination**. Floral Biology (D.G. Lloyd & S.C.H. Barrett, eds), pp. 191– 216. Chapman & Hall, New York, 1996.

STANTON, M. L.; SNOW, A. A.; HANDEL, S. N. Floral evolution: attractiveness to pollinators male fitness. **Science**, v. 232, p. 1625-1627, 1986.

STANTON, M.; YOUNG, H. J. Selecting for floral character associations in wild radish, *Raphanus sativus* L. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 7, n. 3, p. 271-285, 1994.

SUN, S.; LESHOWITZ, M. I.; RYCHTÁŘ, J. The signalling game between plants and pollinators. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 66-86, 2018.

TOWNSEND, C. R.; BEGON, M.; HARPER, J. L. Predação, pastejo e doença. In: **Fundamentos em ecologia**. TOWNSEND, C. R.; BEGON, M.; HARPER, J. L. (Orgs.). Porto Alegre: Artmed. p. 248-284, 2010.

TRUNSCHKE, J.; SLETVOLD, N.; ÅGREN, J. Interaction intensity and pollinator-mediated selection. **New Phytologist**, v. 214, n.3, p. 1381-1389, 2017.

VALLEJO-MARÍN, M.; SILVA, E. M.; SARGENT, R. D.; BARRETT, S. C. H. Trait correlates and functional significance of heteranthery in flowering plants. **New Phytologist**, v. 188, n. 2, p. 418-425, 2010.

VASCONCELOS, T. N.; PROENÇA, C. E. Floral cost vs. floral display: Insights from the megadiverse Myrtales suggest that energetically expensive floral parts are less phylogenetically constrained. **American Journal of Botany**, v. 102, n. 6, p. 900-909, 2015.

VAUGHTON, G.; RAMSEY, M. Pollinator-mediated selfing erodes the flexibility of the best-of-both-worlds mating strategy in Bulbine vagans. **Functional Ecology**, v. 24, n. 2, p. 374–382, 2010.

VOS, J. M.; KELLER, B.; ISHAM, S. T.; KELSO, S.; CONTI, E. Reproductive implications of herkogamy in homostylous primroses: variation during anthesis and reproductive assurance in alpine environments. **Functional Ecology**, v. 26, n. 4, p. 854–865, 2012.

VRIELING, K.; SAUMITOU-LAPRADE, P.; CUGUEN, J.; VAN DIJK, H.; DE JONG, T.J.; KLINKHAMER, P. G. L. Direct and indirect estimates of the selfing rate in small and large individuals of the bumblebee pollinated *Cynoglossum officinale* L. (Boraginaceae). **Ecology Letters**, v. 2, p. 331–337, 1999.

WASER, N. M.; PRICE, M. V. Pollinator choice and stabilizing selection for flower color in *Delphinium nel-sonii*. **Evolution**, v. 35, p. 376–390, 1981.

WEBB, C. J.; LLOYD, D. G. The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigmas in angiosperms. II. Herkogamy. **New Zealand Journal of Botany**, v. 24, p. 163–178, 1986.

WESTERKAMP, C. Ricochet pollination in Cassias – and how bees explain enantiostyly. In: Magalhães F.B., Pereira J.O., eds. Solitary bees: conservation, rearing and management for pollination. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará. 2004.

WILSON, P.; THOMSON, J. D. Heterogeneity among floral visitors leads to discordance between removal and deposition of pollen. **Ecology**, v. 72, p. 1503-1507, 1991.

## Capítulo 1

**Honestidade ignorada: abelhas preferem flores menores apesar de relação positiva entre tamanho floral e recompensa de pólen em *Senna aversiflora* (Fabaceae)**

**Manuscrito a ser submetido ao periódico: Plant Biology**

**Qualis: A1**

**Fator de Impacto: 3.877**

**Honestidade ignorada: abelhas preferem flores menores apesar de relação positiva entre tamanho floral e recompensa de pólen em *Senna aversiflora* (Fabaceae)**

Charlane Moura da Silva<sup>1</sup>; Camila Chagas Correia<sup>2</sup>; Natan Messias de Almeida<sup>3</sup>; Arthur Domingos de Melo<sup>4</sup>; Isabel Cristina Machado<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal – PPGBV, Departamento de Botânica, Laboratório de Biologia Floral e Reprodutiva – POLINIZAR, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife, PE, Brasil.

<sup>2</sup> Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal – PPGBV, Departamento de Botânica, Laboratório de Citogenética e Evolução Vegetal – CITOVEGETAL, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife, PE, Brasil.

<sup>3</sup> Universidade Estadual de Alagoas – UNEAL, *Campus III*, Palmeira dos Índios, AL, Brasil.

<sup>4</sup> Laboratório de Interações Ecológicas e Semioquímicos - Universidade de Pernambuco - UPE, Campus de Petrolina, PE, Brasil.

**Autor para correspondência:** arthurdom.melo@gmail.com

## Resumo

As relações entre polinizadores e plantas são guiadas por caracteres florais, que atuam como sinais para a presença de recursos. Em algumas espécies essa interação pode ser complexa devido ao sistema reprodutivo e recurso ofertado, sendo flores de pólen ainda pouco estudadas. Neste contexto, objetivamos investigar a relação das dimensões das estruturas reprodutivas com a quantidade de pólen ofertada e verificar o efeito na atração dos polinizadores em *Senna aversiflora*. A espécie modelo, apresenta enantiostilia monomórfica, um polimorfismo floral que apresenta variação morfológica na deflexão do gineceu, e flores com anteras poricidas dependentes de abelhas que vibram para a liberação dos grãos de pólen. O estudo foi realizado na ReBio de Pedra Talhada- AL, remanescente de Mata Atlântica. Verificamos as dimensões de estruturas florais para analisarmos a relação entre o tamanho floral com a quantidade de pólen. Para verificar o efeito do tamanho das estruturas florais na taxa de visitação, realizamos 100 horas de observações focais. As flores de *S. aversiflora* apresentaram associação entre área das pétalas com quantidade de grãos de pólen, e são visitadas por abelhas de diferentes tamanhos, embora as flores sejam polinizadas apenas por abelhas de médio e grande porte. A frequência de visitas apresentou uma associação inversa ao tamanho floral, desta forma, quanto maior a flor, menor é a frequência de visitas. Nossos achados abordam informações importantes em relação a sinalização da disponibilidade de recurso em flores enantiostílicas de pólen e a associação de área floral na atratividade de abelhas vibradoras.

**Palavras- chave:** Flor de pólen; interações inseto-planta; características florais; sinal honesto.

## Introdução

As interações entre plantas e seus polinizadores são imprescindíveis para manutenção, dinâmica e estruturação das comunidades vegetais, sendo, essas relações fundamentais para o sucesso reprodutivo dos organismos envolvidos (Almeida & Castro 2019; Knauer *et al.* 2021). As relações entre polinizadores e plantas são, em parte, guiadas por atributos florais (simetria, recurso ofertado, entre outros), bem como um conjunto de atributos potencializa a atração dos polinizadores. As espécies usam diversos tipos de sinalização floral aos visitantes florais, como diferentes características morfológicas, tamanho das estruturas florais, coloração, odor e simetria (Gegear & Lavery 2001), que funcionam como guia de orientação para localização de recursos e órgãos reprodutivos (Fenster *et al.* 2006; Schiestl & Johnson 2013; Knauer *et al.* 2021).

As dimensões ou intensidade com que os sinais florais são apresentados podem indicar qualidade e quantidade de recursos variados para os polinizadores, ocasionando, em alguns casos, na escolha de flores mais atrativas pelos polinizadores (Barônio *et al.* 2016). Nesse sentido, a sinalização floral associada positivamente ao recurso disponível é conhecida como honestidade floral (Fenster *et al.* 2006; Ortiz *et al.* 2020), mas é um processo que nem sempre ocorre na natureza (Knauer & Schiestl 2015). A maioria dos casos de honestidade floral refere-se à relação do tamanho floral com a quantidade de néctar (Makino & Sakai, 2007; Schiestl 2015; Sun *et al.* 2018) sendo flores de pólen ainda pouco estudadas.

A possibilidade de prever a quantidade de recursos influencia na escolha das flores pelos polinizadores, podendo impactar na frequência de visitas (Eckhart 1999; Herrera 2005; Knauer *et al.* 2021; Valadão-Mendes *et al.* 2022). Os polinizadores usam desses atributos florais no momento do forrageamento para selecionarem flores que produzem mais recursos, de forma que otimizem as buscas e reduzam os custos energéticos (Benitez-Vieyra *et al.* 2006; Brito *et al.* 2015; Makino & Ohashi 2017). Dessa maneira, alterações morfológicas e funcionais nos traços florais podem ser selecionadas por polinizadores específicos (Herrera 2006). Geralmente, quanto mais frequente, com tamanho adequado (Schaefer *et al.* 2004; Sun *et al.* 2018) e comportamento de coleta propício, mais importante esse agente polinizador será para a reprodução da planta (Fenster *et al.* 2004; Makino & Sakai 2007). Dessa forma, essas características florais podem ser compreendidas como adaptações que favorecem as interações com polinizadores. Além disso, um mesmo atributo floral pode desempenhar diferentes funções, a exemplo de pétalas que podem ao mesmo tempo garantir a sinalização floral e propiciar o ajuste morfológico (Herrera *et al.* 2002; Herrera 2006).

As condições indicadas acima podem ser ainda mais complexas a depender do sistema floral das plantas envolvidas (Armbruster *et al.* 2005; Gómez *et al.* 2008; Knauer & Schiestl 2014). Este é o caso de espécies com enantiostilia, um polimorfismo floral caracterizado por apresentar uma variação morfológica, na qual em uma mesma espécie existem dois morfos florais que se diferem de forma recíproca a partir da deflexão do gineceu para direita ou esquerda do eixo central da flor (Barrett 2002; Jesson *et al.* 2003; Almeida *et al.* 2013b). A ocorrência da enantiostilia confere às flores alto grau de complexidade e dependência dos polinizadores para a sua reprodução, devido a obrigatoriedade do fluxo polínico intermorfo para manutenção do sucesso reprodutivo, requerido por este polimorfismo floral (Jesson & Barrett 2003). A enantiostilia é um sistema floral comum em espécies da subtribo Cassiinae (Fabaceae), principalmente nos gêneros *Chamaecrista* e *Senna* (Amorim *et al.* 2017; Almeida *et al.* 2018; Braga *et al.* 2022).

Flores enantiostílicas, apresentam uma variação morfotípica, onde existem flores ditas Direitas (quando o estigma apresenta deflexão para a direita e anteras para a esquerda) e Esquerdas (estigma à esquerda e anteras à direita), assim, essa organização morfológica de suas estruturas florais, possibilitam fluxo polínico cruzado entre os morfos, o que também pode auxiliar como uma barreira física para evitar a autopolinização, pois existe uma hercogamia intrafloral (Barrett *et al.* 2000; Schiestl & Johnson 2013; Makino & Ohashi 2017). Outra característica floral importante ocorrente nas flores de algumas espécies da subtribo Cassiinae é o androceu heterântero (estames diferem em funcionalidade e tamanho) com deiscência poricida (Marazzi *et al.* 2007; Amorim *et al.* 2017). Anteras poricidas requerem abelhas com comportamento vibratório desempenhado no momento do forrageio para liberação de pólen (Gottsberger & Silberbauer-Gottsberger 1988; Bezerra & Machado 2003), sendo este o único recurso oferecido aos visitantes florais (Marazzi *et al.* 2007; Marazzi *et al.* 2008). Além disso, ainda apresentam diferentes estratégias relacionadas a deposição e captação de pólen no momento da polinização, podendo ocorrer de forma direta (diretamente das anteras; Almeida *et al.* 2015b) e/ou indireta (com auxílio de uma das pétalas, chamada de *cucullus*; Westerkamp 2004; Costa *et al.* 2007; Almeida *et al.* 2013). Da mesma forma, em plantas que oferecem apenas pólen como recurso floral, como no caso das espécies de *Senna*, anteras poderiam ter tanto papel de oferta de recurso como de sinalização floral, ao indicar a quantidade de pólen aos polinizadores (Mitchell *et al.* 2009).

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo investigar a relação das dimensões das estruturas reprodutivas com a quantidade de pólen ofertada e verificar o efeito disso na

atração dos polinizadores em *Senna aversiflora* (Herb.) H.S.Irwin & Barneby. O estudo foi norteado pelas seguintes perguntas, com suas respectivas hipóteses: P1) O tamanho das estruturas florais (corola e anteras) reflete a quantidade de pólen ofertado, sendo as flores honestas em relação a oferta de recursos? H1) Existe uma honestidade, de modo que flores com estruturas de maiores dimensões apresentam maior quantidade de grãos de pólen; P2) De que forma o tamanho das flores está associado com a frequência de visitas dos polinizadores? H2) Flores com estruturas de maiores dimensões apresentam maior atração e, conseqüentemente, maior frequência de visitas.

## **Materiais e Métodos**

### *Área de estudo*

O estudo foi desenvolvido no município de Quebrangulo-AL, nos entornos da Reserva Biológica de Pedra Talhada (9°13'40.81"S e 36°25'39.62"O), um remanescente da Mata Atlântica localizada entre os estados de Pernambuco e Alagoas, Nordeste do Brasil. A reserva apresenta relevo acidentado, variando entre 459m e 883m, com uma área de 4.469 ha (Studer *et al.* 2015). O clima da região é tropical chuvoso, com temperatura média anual de 25°C e precipitação entre 1.250 a 1.500 mm. A estação seca ocorre de outubro a fevereiro e a chuvosa de maio a julho, ambas bem definidas (Studer *et al.* 2015). A área do estudo está localizada em uma região cercada por influência antrópica e frequente uso da terra para manejo agrícola e agropecuário, sendo constituída por diferentes níveis de formação de pediplanos ondulados típicos de regiões de planalto. Grande parte da área tem predominância de pastagens, intercaladas com vegetação arbustiva, subarbustiva e em alguns pontos arbóreas.

### *Espécie estudada*

*Senna aversiflora* (Figura 1) é uma espécie pertencente à subtribo Cassiinae (Fabaceae-Caesalpinioideae). É caracterizada por apresentar flores de coloração amarela providas de heteranteria, sendo quatro anteras centrais e três centro abaxiais (Figura suplementar 1). São denominadas como “flores de pólen”, por possuírem apenas pólen como fonte de recurso floral aos visitantes. Apresentam antese diurna e sua polinização geralmente ocorre por abelhas de médio a grande porte, por meio da vibração das anteras porcidas no momento da visita para liberação e coleta dos grãos de pólen (Buchmann 1983).

### *Indivíduos amostrados*

Para a realização deste estudo, foram marcados 20 indivíduos de *S. aversiflora*, selecionados aleatoriamente conforme a disponibilidade e distribuição na área de estudo. A partir de cada um destes indivíduos, foram coletadas 10 flores, sendo cinco de morfo esquerdo e cinco direito. Estas flores foram utilizadas para mensuração das dimensões das estruturas florais (pétala e antera) com a quantidade de grãos de pólen ofertados. Nestes mesmos indivíduos também realizamos o monitoramento da frequência de visitantes florais ao longo da antese, a partir da qual determinamos sua riqueza e comportamento de visita. Para a escolha dos três indivíduos de *S. aversiflora* a serem observados por dia, o critério de seleção era apresentar a disponibilidade mínima de 25 flores abertas.

#### *Dimensões das estruturas e quantidades de grãos de pólen*

Para esta etapa, as flores foram marcadas em pré antese e ensacadas com saco de tecido “voil”, as quais no dia seguinte foram coletadas e fotografadas em laboratório em distância e posicionamento padronizados. Estas flores foram então desmembradas e suas partes florais foram dispostas em papel milimetrado para fotografia com escala (Figura suplementar 2). As fotos foram utilizadas para mensurar a área das diferentes estruturas florais através do software ImageJ 5.0 (Soft Imaging System GmbH, Munster, Germany).

As anteras de cada flor foram armazenadas individualmente em tubos de Eppendorf imersas em álcool 70%, para posterior contagem de grãos de pólen (Figura suplementar 3) usando uma Câmara de Neubauer (Maêda 1985; Silva *et al.* 2017). Para quantificar o número de grãos de pólen em cada antera, realizamos um cálculo de proporção simples. A contagem foi realizada com auxílio de um microscópio óptico (100x) com câmera acoplada modelo Eakins 14 mp Full HD HY-2307. Realizado com duas repetições (câmara superior e inferior), sendo cada repetição constituída por quatro leituras das grades de contagem na câmara de Neubauer (N= 8 leituras nas grades de contagem por antera).

#### *Observações focais*

Acompanhamos a frequência dos visitantes florais durante sete dias de observações diretas e focais, conduzidas durante o período da manhã das 6:00h às 11:00, por ser o período de maior fluxo de visita das abelhas. Cada um dos 20 indivíduos foi amostrado sistematicamente durante cinco horas, sendo três indivíduos acompanhados a cada dia. Ao total, contabilizamos um esforço amostral de 100 horas de amostragem. Todas as flores nos indivíduos observados foram previamente ensacadas com tecido “voil”. Durante as observações

registramos a espécie de visitante floral, o horário e o número de abordagens a cada indivíduo e o número de flores visitadas, bem como seus diferentes comportamentos: polinizador (classificado a partir do toque entre as estruturas reprodutivas (estigma e antera) no momento da visita) ou pilhador, (classificado quando deteriorava partes florais no momento da visita para conseguir recurso). Estas mesmas flores foram fotografadas em campo ainda no indivíduo com auxílio de um mini studio (Figura suplementar 4) de coloração interna preta e abertura de suporte para encaixar a flor. Posteriormente, realizamos a mensuração da área total em flores direitas e esquerdas, onde foram utilizadas 10 flores de 20 indivíduos, totalizando 200 imagens. A mensuração desses dados foi realizada por meio de imagens digitais, através do software ImageJ 5.0 (Soft Imaging System GmbH, Munster, Germany).

### *Análise dos dados*

Para verificar se as áreas de pétalas e anteras (tanto as de polinização e alimentação) estavam relacionadas entre si, utilizamos uma matriz de correlações de Pearson. Utilizamos LMMs para verificar se a área total da flor (área total do conjunto floral levando em consideração o contorno externo das pétalas) possibilitaria prever a quantidade total de pólen presente nos diferentes tipos de anteras. Os modelos tiveram como variáveis explicativas a área total da flor e o tipo de antera (polinização ou alimentação), bem como a interação entre ambas. Os indivíduos amostrados foram inseridos como variáveis aleatórias. A variável resposta foi a quantidade total de pólen presentes na flor. Testamos diferenças significativas de cada variável através da comparação dos modelos aninhados através da estimativa de máxima verossimilhança restrita. Essas análises foram realizadas com o pacote lme4 (Bates *et al.* 2015) implementado no software R (R Core Team, 2021).

A fim de verificar o efeito da área total da flor sobre a frequência de visitas de *Xylocopa grisescens* (principal abelha polinizadora – ver resultados), ao longo dos diferentes horários, ajustamos diferentes GLMs. Os modelos tiveram como variáveis explicativas a média da área floral total para cada indivíduo e o horário de observação (estes foram transformados em uma variável categórica de cinco níveis: T1 – 6h à 7h; T2 – 7h às 8h; T3 – 8h às 9h; T4 - 9h às 10h; e T5 – 10h às 11h), bem como a interação entre eles. As variáveis resposta foram o número de abordagens a cada indivíduo e o número de flores visitadas neste indivíduo a cada hora. Essas análises foram realizadas com o pacote base do software R (R Core Team 2021).

## **Resultados**

### *Tamanhos das estruturas florais e disponibilidade de recurso*

A maior parte da área visível da flor são as pétalas, ocupando uma maior área total floral (93.12%). Conseqüentemente, as anteras ocupam uma pequena parte da área floral, sendo esta ligeiramente maior para as anteras de alimentação (Tabela 1), que estão em maior número (quatro) em relação às anteras de polinização (três). Existe uma alta correlação entre as áreas ocupadas pelos diferentes tipos de anteras (alimentação & polinização), bem como da superfície das pétalas com os dois grupos de anteras (Tabela 1). Assim, registramos que a quantidade de grãos de pólen varia significativamente entre os tipos de anteras (Tabela 2), de modo que, em conjunto, as anteras de alimentação produzem maior quantidade de pólen do que o grupo das anteras de polinização (Fig 2A). Verificamos também que a área total da flor está significativamente relacionada com a quantidade de grãos de pólen (Tabela 2). A interação entre os fatores (tipo de antera e área total da flor) não foi estatisticamente significativo (Tabela 2), indicando que a relação da área total da flor com a quantidade de pólen produzida ocorre de forma semelhante e positiva em ambos os tipos de antera (Fig 2B). Ou seja, quanto maior a flor, mais pólen está presente em ambos os tipos de antera.

### *Frequência de visitas e amostragem dos visitantes florais*

*Senna aversiflora* é visitada por abelhas de diferentes tamanhos, mas só as abelhas de médio e grande porte atuam como polinizadoras. Foram observadas 14 espécies visitantes nas flores (Tabela suplementar 1). Os polinizadores (Figura suplementar 5) efetivos observados foram: duas abelhas do gênero *Bombus*, duas do gênero *Centris*, *Eulaema bombiformis* e cinco espécies de *Xylocopa*. Já a espécie de Halictidae, *Melipona quadrifasciata*, *M. subnitida* e *Trigona spinipes* foram consideradas pilhadoras (Figura suplementar 6).

Alguns indivíduos de *Xylocopa grisescens* apresentaram padrão de visita semelhante em relação à chegada e saída da flor, mantendo sempre uma direção, demonstrando manutenção de sua rota de forrageio. Outras espécies visitantes foram consideradas pilhadoras, como *Trigona spinipes*, esta, por sua vez, foi observada consumindo as anteras realizando cortes e danificando o tecido floral. Em alguns casos, impediu que outras abelhas realizassem visitas nas flores. Quando consideramos abelhas de médio e grande porte observamos que estas conseguem vibrar todas as anteras de uma só vez, sendo suas visitas mais curtas em cada flor. Já *Halictidae* e *Trigona spinipes*, realizavam visitas mais longas, ultrapassando três minutos por flor.

O principal polinizador foi *Xylocopa grisescens*, que abordou os indivíduos 778 vezes durante as 100 horas de observação, realizando 2782 visitas em flores individuais (média de 3.58 visitas por abordagem). A segunda abelha que mais contribuiu como polinizadora foi *Bombus* sp1, que abordou os indivíduos 11 vezes, realizando 41 visitas em flores individuais (média de 3,73 visitas a cada abordagem) (Tabela 3). Dentre os pilhadores, *Halictidae* e *Trigona spinipes* foram as que mais realizaram abordagens por indivíduo, sendo 28 e 21, e um total de visitas de 30 e 34, respectivamente. Em termos relativos, tanto em número total de visitas a flores individuais quanto em número de abordagens aos indivíduos, *Xylocopa grisescens* foi a mais frequente, apresentando 85.49% das abordagens registradas de visita aos indivíduos, e 90.74% das visitas a flores individuais.

#### *Efeito da área floral na frequência de visitas de Xylocopa grisescens em função ao horário*

Verificamos que a frequência de visitas de *Xylocopa grisescens* à *Senna aversiflora* é afetada pela área das flores de forma significativa (Tabela 4) e negativa (Figura 3A), demonstrando que a frequência de visitas apresentou uma associação inversa ao tamanho floral. Assim, quanto maior a flor menor a frequência de visitas. Também verificamos que o horário de observação tem um efeito significativo sobre a frequência de visitas (Tabela 4), sendo o horário T3 apresentando maior número de visitas (Figura 3B). Além disso, a depender do horário, o efeito da área floral sobre a frequência de visitas pode variar, conforme revelado pelo efeito significativo da interação entre essas variáveis (Tabela 4; Figura 3C). Esse padrão se repetiu de forma semelhante tanto em relação ao número de abordagens aos indivíduos, quanto à quantidade de visitas a flores individuais.

Ao visualizarmos o efeito da área floral sobre a frequência de visitas ao longo dos diferentes horários da antese (Figura 3C), verificamos que em T1 não houve relação entre o tamanho floral e a frequência de visitas. A partir de T2 percebemos que quanto maior o tamanho da flor menor a frequência de visitas. Em T3 e T4 esse processo ocorre de forma mais linear, mesmo assim mantendo a relação negativa entre o tamanho floral e a frequência de visitas. No horário T5, esse processo volta a apresentar um maior efeito. Ou seja, embora na maioria dos horários tenha um efeito negativo da área total da flor na frequência de visitação, a força desse efeito varia ao longo do dia, indicando que o horário afeta a relação entre sinalização floral e frequência de visitas.

## **Discussão**

Nossos achados mostram que flores com pétalas maiores vão apresentar anteras de

polinização e de alimentação maiores, e que a área total da flor está diretamente relacionada com a quantidade de grãos de pólen produzidos. As observações focais mostraram que *Senna aversiflora* recebeu visitas de diferentes espécies de abelhas, mas somente as abelhas de médio e grande porte atuam como polinizadoras, realizando movimentos vibratórios para coleta de recursos. Dentre os polinizadores, *Xylocopa grisescens* foi mais frequente, com maiores taxas de abordagens aos indivíduos e visitas em flores. Verificamos que a frequência de visitas de *X. grisescens* é afetada tanto pela área floral, quanto pelo horário de visita, havendo uma relação negativa com o tamanho floral. Identificamos que essa relação negativa ocorre na maioria dos intervalos de observação, mas sua intensidade varia ao longo dos diferentes horários. Abaixo discutimos esses achados e suas possíveis causas e consequências.

#### *Tamanhos das estruturas florais e disponibilidade de recurso*

A relação entre o tamanho floral e a quantidade de recurso presente nas flores é geralmente demonstrada como positiva (Fenster *et al.* 2006; Knauer & Schiestl 2015; Burdon *et al.* 2020; Knauer *et al.* 2021). Nestes casos, o tamanho da flor é interpretado como um sinal visual responsável pela indicação da disponibilidade do recurso (Fenster *et al.* 2006; Knauer & Schiestl 2015; Ortiz *et al.* 2020). Quando essa relação é notória é possível que o tamanho floral exerça um efeito positivo sobre a frequência de visitas realizadas pelo polinizador (Gomez *et al.* 2008; Sun *et al.* 2018; Basso-Alves *et al.* 2022).

Em nosso estudo o tamanho da área floral foi interpretado como uma sinalização, corroborando com estudos que demonstram também a relação positiva entre o tamanho floral e número de grãos de pólen (Vallejo-Marín *et al.* 2014; Burdon *et al.* 2020; Delgado *et al.* 2023). Em Cassiinae, o tamanho da flor pode atuar como um sinal visual, devido a área de percepção associada às pétalas, que apresentam coloração amarela bastante perceptível. Dessa forma, a cor atua como fator de reconhecimento a longa distância (Silberbauer-Gottsberger & Gottsberger 1988; Manente-Balestieri & Machado 1999; Carvalho & Oliveira 2003), desempenhando papel importante em relação à atratividade (Marazzi *et al.* 2007). A coloração amarela é a mais presente na maioria das flores, seja em grande parte da estrutura floral ou restritas a pequenas áreas de guias de recurso, que atraem tanto polinizadores generalistas quanto especialistas (Burdon *et al.* 2020; Essenberg *et al.* 2021).

A relação entre atratividade visual e recompensa floral, depende, em parte, da limitação na produção e disponibilidade do recurso, sendo este finito em flores de Cassiinae (flores de pólen). Nestas flores, o pólen desempenha dupla função, ou seja, parte do que é produzido pelas flores é direcionado para alimentação e outra parte para polinização, estes diferindo em

função e composição, de modo que geralmente o primeiro tipo apresenta uma capacidade proteica alta e viabilidade reprodutiva baixa e o segundo tipo apresenta uma alta capacidade reprodutiva e taxas proteicas mais baixas (Carvalho & Oliveira 2003). Em flores de *Senna*, às anteras de alimentação podem ser consideradas como um sinal atrativo (Carvalho & Oliveira 2003), visto que nessas estruturas encontram-se zonas odoríferas que auxiliam no direcionamento aos locais onde encontram-se os recursos para alimentação (Oliveira *et al.* 2021; Essenberg 2021). Em nossos achados, constatamos que as anteras de alimentação com maior área, talvez por ter mais anteras com essa função na flor, apresentam maior quantidade de grãos de pólen, demonstrando que estas estruturas têm potencial para atuar como atrativos para os visitantes (Luo *et al.* 2008; Solís-Montero *et al.* 2017; Velloso *et al.* 2018; Saab *et al.* 2021). Levando-se em consideração a posição das anteras de alimentação (centrais no display floral) no mesmo local em flores direitas e esquerdas em *Senna aversiflora*, ambos os morfos podem exercer atração de maneira semelhante.

Nestas flores, o pólen é a única recompensa floral, gerando um dilema do pólen (Lunau *et al.* 2014; Ferreira & Araújo 2016; Saab *et al.* 2021), pois este recurso é utilizado tanto na alimentação das abelhas como na reprodução das plantas. Mas, a heteranteria e a presença de anteras poricidas na espécie favorece maior otimização desse recurso (Olito *et al.* 2018). Uma vez que encontramos maior quantidade de pólen nas anteras (alimentação e polinização) maiores (Toledo *et al.* 2020; Essenberg 2021), parece existir investimento não só na sinalização visual e oferta de recursos, mas na função masculina como um todo (Vallejo-Marín & Rausher 2007a). Assim, enquanto o display floral atua na atratividade à distância (Mitchell *et al.* 2004; Melo *et al.* 2018) o aumento das anteras de alimentação poderia otimizar o direcionamento e ajuste de pouso entre os verticilos florais para a extração de recurso (Goodwillie *et al.* 2010; Moore & Pannell 2011), e o aumento das anteras de polinização otimizaria o fitness masculino, devido à maior disponibilidade polínica (Vallejo-Marín & Rausher 2007b; Paterno *et al.* 2019).

#### *Frequência de visitas e amostragem dos visitantes florais*

A espécie demonstrou uma diversificada guilda de visitantes florais, desde abelhas pilhadoras de pequeno porte até abelhas polinizadoras efetivas de médio e grande porte, conforme reportado para outras espécies da subtribo Cassiinae (Carvalho e Oliveira 2003; Westerkamp 2004; Laporta 2005; Nascimento & DelClaro 2007; Almeida 2012; Almeida *et al.* 2013a,b). Das espécies visitantes, *Xylocopa grisea* foi a principal abelha polinizadora, devido seu comportamento nas flores, contactando as estruturas sexuais e coletando pólen de

forma legítima, e por demonstrar uma maior frequência de visitas em relação às demais. Em relação à atratividade, espécies de *Xylocopa*, de modo geral são atraídas por flores de diferentes colorações, odores e formas florais. Dentre os recursos disponíveis, abelhas deste gênero buscam principalmente por recurso energético, o néctar, e por recurso proteico, o pólen (Agostini *et al.* 2014).

Neste contexto, representantes da subtribo Cassiinae ofertam pólen como único recurso, além de um conjunto de atrativos, como flores amarelas, anteras poricidas, diferenciação de cores entre verticilos vegetativos e reprodutivos, possibilitando atratividade a longa distância por abelhas no forrageamento polínico (Silberbauer-Gottsberger & Gottsberger 1988). Espécies de *Xylocopa* têm sido frequentemente registradas como visitantes em flores de representantes da subtribo Cassiinae (Carvalho & Oliveira 2003; Laporta 2005; Nascimento & Del-Claro 2007; Wolowski & Freitas 2010; Souza *et al.* 2012; Almeida 2012; Almeida *et al.* 2013a b). A capacidade de forrageio dessas abelhas, acontece em função da necessidade da constante coleta de pólen, dessa maneira, a preferência por flores de menor tamanho pode estar relacionada à otimização de sua capacidade de forrageamento e à minimização da competição por recursos com outras espécies (Laporta, 2005; Brito *et al.*, 2020). Isso pode ocorrer devido a alguns fatores, como: flores menores podem oferecer mais fácil acesso ao pólen, economizando tempo e energia para as abelhas experientes, o que reduz a competição com abelhas que preferem flores maiores e de difícil acesso (Solís-Montero; Vallejo-Marín, 2017). Além disso, apesar de flores maiores conterem mais recursos em uma única visita, as abelhas percebem que visitar várias flores menores rapidamente pode resultar em uma quantidade similar ou maior de recursos, otimizando seu forrageamento (Stang, *et al.*, 2009; Solís-Montero; Vallejo-Marín, 2017). A economia de energia é outra razão, já que flores menores exigem menos esforço para coletar pólen. Por fim, a tendência a escolher flores menores permite que as abelhas explorem nichos florais menos disputados, evitando a competição direta com outras espécies polinizadoras que preferem flores maiores, contribuindo para uma coexistência mais harmoniosa e segura no ambiente (Laporta, 2005; Solís-Montero; Vallejo-Marín, 2017; Brito *et al.*, 2020).

Esse comportamento de visitas pode beneficiar o aumento do fluxo de pólen entre os morfos florais (Gilbert *et al.* 2001). Assim, espécies de *Xylocopa* que interagem com estes tipos florais efetivamente são devido a relação do limiar de tamanho mínimo, onde existe uma proporção entre a disposição dos verticilos reprodutivos e o corpo do polinizador (Mesquita-Neto *et al.* 2017). Essa relação planta-polinizador pode ser observada em nosso estudo, quando ocorrem maiores taxas de frequência de visitas por *X. grisescens* na espécie estudada,

sobrepondo as taxas de visita de outros espécimes da guilda. Esses fatores podem ser explicados pelo hábito de forrageamento generalista dessa abelha quando comparada a outros visitantes florais, apresentando, assim, maior aptidão frente às influências ambientais e competição por recurso com outros visitantes (Junqueira *et al.* 2012, 2017; Kaluza *et al.* 2017).

#### *Efeito da área floral na frequência de visitas de *Xylocopa grisescens* em função ao horário*

Estudos mostram que em um contexto interespecífico, o tamanho floral das espécies de uma comunidade afeta a frequência de visita das plantas, sendo esse efeito positivo em relação à atratividade e riqueza da guilda de visitantes (Vallejo-Marín *et al.* 2009, 2010, 2014; Delgado *et al.* 2023), uma vez que espécies com flores maiores apresentam maior taxa de visitas quando comparadas às espécies que possuem flores menores (Delgado *et al.* 2023). Em condições intraespecíficas, a relação da recompensa floral e atratividade dentro de cada espécie é reforçada quando se observa um impacto na preferência do polinizador no momento do forrageamento (Armbruster *et al.* 2005; Bell *et al.* 2005; Gómez *et al.* 2008; Toledo *et al.* 2020; Knauer *et al.* 2021; Toji *et al.* 2021; Russel *et al.* 2021). Em nosso trabalho, apesar do tamanho floral possuir uma associação positiva com a disponibilidade de pólen, ele exerce um efeito negativo sobre a frequência de visitas, resultando em uma redução na frequência de visitas em flores maiores. O horário do dia tem uma influência no efeito, embora geralmente o padrão seja constante, de mais visitas de *Xylocopa grisescens* em flores menores.

Não detectamos efeito do tamanho floral na frequência de visitas em T1, no geral, as visitas dentro do T1 correspondem às primeiras visitas do dia. Observamos que o horário de maior pico ocorreu no T3, quando podemos observar o aumento significativo da quantidade de visitas, mantendo a preferência de *X. grisescens* por flores menores. Em outros períodos as taxas sofreram redução, mas a relação negativa entre tamanho floral e número de visitas foi constante. Nas primeiras visitas às flores, podemos observar que a partir da vibração desempenhada pelo polinizador, é perceptível a liberação de uma "nuvem de pólen" ejetada das anteras em direção ao polinizador, sendo parte deste depositado em locais do corpo do polinizador (Huang & Shi 2013; Amorim *et al.* 2017), de forma direta pelas anteras de alimentação ou por deposição indireta com o auxílio da pétala curvada (Westerkamp 2004; Almeida *et al.* 2013b; Amorim *et al.* 2017). Mas, é visível a perda de uma quantidade considerável de grãos de pólen nas primeiras visitas do dia, o que já foi observado em outros estudos (Bezerra & Machado 2003).

Ampliando as possibilidades de efeito sobre a maior visitação em flores menores em determinados horários da observação, além da fonte de atração (tamanho floral), diferentes

atributos atuam como atrativos florais ao visitante (Koch; Wester; Lunau 2017; Melo et al. 2018; Aguiar et al., 2020), podemos pensar em outras fontes, como odor, coloração (UV). Bem como, a cognição do polinizador (Brito et al. 2015), que desempenha um papel fundamental na seleção das flores a serem visitadas. É possível que *X. grisescens*, ao longo de suas interações com as flores, desenvolveu uma memória floral que inclua informações sobre a facilidade de acesso ao pólen em flores de diferentes tamanhos, podendo influenciar diretamente em suas preferências de forrageamento e, conseqüentemente, a frequência de visitas a flores de diferentes tamanhos.

Os polinizadores reagem aos atrativos florais tanto por instinto quanto por meio do aprendizado, e essa relação é mediada por processos cognitivos essenciais (Agostini *et al.*, 2014; Ramos; Schiestl, 2020; Essenberg, 2021). Nesse sentido, a tomada de decisão dos polinizadores para visitar uma flor é influenciada por diversos fatores, incluindo suas preferências inatas e aquelas adquiridas ao longo do tempo por meio de experiências anteriores. Estas preferências podem estar associadas à memória das características específicas das flores, como tamanho, odor, coloração e facilidade de acesso ao néctar ou ao pólen (Vallejo-Marín et al., 2009; Brito & Sazima, 2012). É interessante observar que a capacidade de aprendizado dos insetos, frequentemente subestimada, tem sido demonstrada como rápida e com uma memória eficaz (Chittka & Thomson, 2001). Dessa maneira, a cognição desempenha um papel fundamental nas escolhas dos polinizadores, influenciando suas preferências por flores com base em uma variedade de atributos. Com o tempo, os polinizadores desenvolvem memórias florais que afetam diretamente seu comportamento de forrageamento, moldando suas preferências e determinando a frequência com que visitam flores de diferentes tamanhos e características (Koch; Wester; Lunau 2017; Melo et al. 2018; Aguiar et al., 2020).

O aprendizado das abelhas em relação à otimização de suas visitas em flores está intimamente ligado à sua capacidade cognitiva. Em um contexto comum de flores que oferecem apenas pólen como recurso, as abelhas demonstram uma notável habilidade de aprendizado rápido e duradouro. Elas conseguem identificar facilmente a localização do pólen, o que sugere a presença de preferências inatas. No entanto, essa preferência pode ser modificada com base em experiências anteriores, na retenção de informações a longo prazo e no aprendizado associativo, conforme observado por Russell *et al.* (2015).

Um aspecto fundamental desse processo é a capacidade das abelhas de reconhecerem flores a uma longa distância, utilizando as pistas visuais fornecidas pelas pétalas, como apontado por Brito et al. (2015). No entanto, à medida que se aproximam das flores, as características das anteras, onde o pólen está localizado, se tornam mais detectáveis e

informativas para essas visitantes. Este fenômeno ilustra a adaptação das abelhas para otimizar suas interações florais, ajustando seu comportamento à medida que se aproximam do recurso desejado.

Além disso, estudos recentes, conduzidos por Ruedenauer et al. (2015), destacam a notável capacidade das abelhas em detectar e distinguir diferentes tipos e qualidades de pólen. Isso sugere uma complexa capacidade cognitiva que permite às abelhas avaliar e selecionar o melhor recurso alimentar com base em suas necessidades nutricionais. Em conjunto, essas descobertas evidenciam a sofisticação da cognição das abelhas no contexto de otimização de visitas em flores e interações florais.

Assim, podemos observar que as interações entre plantas e polinizadores, devem ser avaliadas não apenas o tamanho da área floral, mas também a eficácia da polinização e a cognição do polinizador no momento da avaliação das flores e consequente visita no momento da busca pelo recurso. Nesse contexto, nossos resultados sugerem que a área da corola e da antera não estão positivamente envolvidas na resposta de maior frequência. Estudos futuros devem ser realizados, verificando outras variáveis que possam gerar maior atratividade e disponibilidade de recursos nas flores.

### **Agradecimentos**

Agradecemos ao Instituto Chico de Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) pela autorização do estudo na Reserva Biológica de Pedra Talhada, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Pernambuco (PPGBV-UFPE), ao Laboratório de Pesquisa em Angiospermas da Caatinga - LaPac da Universidade Estadual de Alagoas - UNEAL/*Campus* II pelo apoio laboratorial e a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela bolsa de Mestrado concedida à C.M. SILVA.

### **Referências**

Agostini K, Lopes AV, Machado IC. 2014. Recursos florais. In: A. R. Rech, K. Agostini, P. E. Oliveira; I. C. Machado (Eds.), *Biologia da polinização*. pp. 130–150. Rio de Janeiro: Editora Projeto Cultural.

Aguiar JMRBV, Telles FJ, Bergamo PJ, Brito VLG & Sazima M. 2020. *Oecologia Australis* 24(1):45-60.

Almeida NM. 2012. Comportamento dos visitantes e padrões de deposição e captura de pólen para estimativa do fitness reprodutivo. *In*: Leal, I.R., Meiado, M., Rabbani, A.R.C., Siqueira Filho, J.A. (Eds.), *Ecologia da Caatinga: Curso de campo 2011*. Gráfica Printpex, Petrolina, pp. 353–366.

Almeida NM, Castro CC, Leite AV, Novo RR, Machado IC. 2013a. Enantiostyly in *Chamaecrista ramosa* (Fabaceae-Caesalpinioideae): floral morphology, pollen transfer dynamics and breeding system. *Plant Biology* **15**: 369-375.

Almeida NM, Castro CC, Leite AV, Novo RR, Machado IC. 2013b. Floral polymorphism in *Chamaecrista flexuosa* (Fabaceae-Caesalpinioideae): a possible case of atypical enantiostyly?. *Annals of Botany* **112** (6): 1117-1123.

Almeida NM, Bezerra TT, Oliveira CRS, Novo RR, Siqueira-Filho JÁ, Oliveira PE, Castro CC. 2015a. Breeding systems of enantiostylous Cassiinae species (Fabaceae, Caesalpinioideae). *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* **215**: 9-15.

Almeida NM, Cotarelli VM, Souza DP, Novo RR, Siqueira Filho JA, Oliveira PE, & Castro CC. 2015b. Enantiostylous types of Cassiinae species (Fabaceae-Caesalpinioideae). *Plant Biology*, **17**(3), 740-745.

Almeida NM, Souza JT, Oliveira CRS, Bezerra TT, Novo RR, Siqueira Filho JA, Oliveira PE, Castro CC. 2018. Functional dimorphic enantiostyly in monomorphic enantiostylous species of the subtribe Cassiinae (Fabaceae-Caesalpinioideae). *Plant Biology* **20**(4): 797-801.

Almeida NM, Castro CC. 2019. Enantiostyly in Angiosperms. *In*: BAHADUR, B., *et al.*, eds. *Asymmetry in Plants: Biology of Handedness*, p. 319-329.

Amorim T, Marazzi B, Soares A, Forni-Martins ER, Muniz CR, Westerkamp C. 2017. Ricochet pollination in *Senna* (Fabaceae) - petals deflect pollen jets and promote division of labour among flower structures. *Plant Biology* **19**(6): 951-962.

Armbruster WS, Antonson L, Pelabon C. 2005. Phenotypic selection on *Dalechampia blossoms*: Honest signaling affects pollination success. *Ecology* **86**(12): 3323-3333.

Barônio GJ, Maciel AA, Oliveira AC, Kobal ROAC, Meireles DAL, Brito VLG, Rech AR. 2016. Plantas, polinizadores e algumas articulações da biologia da polinização com a teoria ecológica. *Rodriguésia* **67(2)**: 1-19, 2016.

Barrett SCH, Jesson LK, Baker AM. 2000. The evolution and function of stylar polymorphisms in flowering plants. *Annals of Botany* **85**: 253-265.

Barrett SCH. 2002. The evolution of plant sexual diversity. *Nature Reviews Genetics*, v. 3, p. 274– 284.

Bell J. M., Karron J. D., Mitchell R. J. 2005. Interspecific competition for pollination lowers seed production and outcrossing in *Mimulus ringens*. *Ecology* **86(3)**: 762-771.

Basso-Alves JP, Silva RF, Coimbra G, Leitão SG, Rezende CM, Bizzo HR, Freitas L, Paulino JV, Mansano VF. 2022. Heteromorphic stamens are differentially attractive in *Swartzia* (Fabaceae). *AoB PLANTS*, **14 (5)**.

Bezerra ELS, Machado, IC. 2003. Biologia floral e sistema de polinização de *Solanum stramonifolium* Jacq. (Solanaceae) em remanescente da Mata Atlântica, Pernambuco. *Acta Botanica Brasílica* **17(2)**: 247-257.

Braga, BLP, Matias, R, Consolaro, H, Souza, JT, Almeida, NM. 2022. Inaccuracy of sexual organ position and spatial variation of styles in monomorphic enantiostylous flowers of *Senna rugosa* (Fabaceae-Caesalpinioideae). *Flora*, **293**.

Brito, VLG, Sazima M. 2012. *Tibouchina pulchra* (Melastomataceae): reproductive biology of a tree species at two sites of an elevational gradient in the Atlantic Rainforest in Brazil. *Plant Systematics and Evolution* **298**: 1271–1279

Brito VLG, Weynans K, Sazima M, 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)**: 1-10.

Brito VLG, Nunes CEP, Resende CR, Montealegre-Zapata, F, Vallejo-Marín M. 2020. Biomechanical properties of buzz-pollinated flower. *Royal Society Open Science* **7**: 1-9.

- Buchmann SL. 1983. Buzz pollination in Angiosperms. In: Jones, C.E.; Little, R.J. (eds.) Handbook of Experimental Pollination Biology. *Van Nostrand Reinhold*, New York. Pp. 73-113.
- Burdon RCF, Raguso RA, Gegear RJ, Pierce EC, Kessler A, Parachnowitsch AL. 2020. Scented nectar and the challenge of measuring honest signals in pollination. *Journal of Ecology* **108**: 2132–2144.
- Carvalho DA, Oliveira PE. 2003. Biologia reprodutiva e polinização de *Senna sylvestris* (Vell.) H.S. Irwin & Barneby (Leguminosae, Caesalpinioideae). *Revista Brasileira de Botânica* **26(3)**: 319-328.
- Costa CBN, Lambert SM, Borba EL, Queiroz LP. 2007. Postzygotic reproductive isolation between sympatric taxa in the *Chamaecrista desvauxii* complex (Leguminosae-Caesalpinioideae). *Annals of Botany* **99**: 625–635.
- Chittka L, Thomson, JD. 2001. Cognitive Ecology of Pollination: Animal Behaviour and Floral Evolution. Cambridge University Press.
- Delgado T, Leal LC, Ottra JHLE, Brito VLG, Nogueira A. 2023. Flower size affects bee species visitation pattern on flowers with poricidal anthers across pollination studies. *Flora* **299**.
- Dutra VF, Vieira MF, Garcia FCP, Lima HC. 2009. Fenologia reprodutiva, síndromes de polinização e dispersão em espécies de Leguminosae dos campos rupestres do Parque Estadual do Itacolomi, Minas Gerais, Brasil. *Rodriguésia* 60(2) 371-387.
- Essenberg CJ. 2021. Intraspecific relationships between floral signals and rewards with implications for plant fitness. *AoB PLANTS* **13(2)**.
- Fenster CB, Armbruster WS, Wilson P, Dudash MR, Thomson JD. 2004. Pollination syndromes and floral specialization. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **35**: 375-403.
- Fenster CB, Cheely G, Dudash MR, Reynolds RJ. 2006. Nectar reward and advertisement in hummingbird-pollinated *Silene virginica* (Caryophyllaceae). *American Journal of Botany* **93(12)**: 1800–1807.
- Ferreira QIX, Araújo FP. 2016. Economia de pólen favorecida pela heteranteria em *Desmocelis villosa* (Melastomataceae). *Rodriguésia* **67(2)**: 347-355.

Fijen TPM, Kleijn D. 2017. How to efficiently obtain accurate estimates of flower visitation rates by pollinators. *Basic and applied ecology*.

Fründ J, Dormann CF, Holzschuh A, Tschardt T. (2013). Bee diversity effects on pollination depend on functional complementarity and niche shifts. *Ecology* **94**: 2042–2054.

Gegear RJ, Lavery TM. 2001. The effect of variation among floral traits on the flower constancy of pollinators. *Cognitive ecology of pollination: Animal Behavior and Floral Evolution*.

Gilbert F, Azmeh S, Barnard C, Behnke J, Collins SA, Hurst J, Shuker D. 2001. Individually recognizable scent marks on flowers made by a solitary bee. *Animal Behaviour* **61**: 217-229.

Gómez, J. M., Bosch, J.; Perfectti, F.; Fernández J. D., Abdelaziz, M., and Camacho, J. P. M. 2008. Association between floral traits and rewards in *Erysimum mediohispanicum* (Brassicaceae). *Annals of Botany* **101(9)**: 1413–1420.

Goodwillie C, Sargent, RD, Eckert CG, Elle E, Geber MA, Johnston MO, Kalisz S, Moeller, DA, Ree RH, Vallejo-Marin M, Winn AA. 2010. Correlated evolution of mating system and floral display traits in flowering plants and its implications for the distribution of mating system variation. *New Phytologist* **185(1)**: 311-21.

Gottsberger G, Silberbauer-Gottsberger I. 1988. Evolution of flower structures and pollination in Neotropical Cassiinae (Caesalpiniaceae) species. *Phyton (Austria)* **28**: 293- 320.

Gómez GA. 2008. Biología reproductiva de *Chamaecrista chamaecristoides* (Fabaceae), especie enantiostilica de las dunas costeras. MSc, Instituto de Ecología, A.C., Xalapa, México, pp 72.

Herrera CM, Cerda X, Garcia MB, Guitian J, Medrano M, Rey PJ, Sanchez-Lafuente AM. 2002. Floral integration, phenotypic covariance structure and pollination variation in bumblebee-pollinated *Helleborus foetidus*. *Journal of Evolutionary Biology* **15**: 108–121.

Herrera CM, Castellanos MC, Medrano M. 2006. Geographical context of floral evolution: towards an improved research programme in floral diversification, *In: HARDER, L. D., Barrett, S. C. H. (Eds.), Ecology and evolution of flowers*. Oxford Univ. Press, p. 278–294.

- Huang SQ, Shi XQ. 2013. Floral isolation in *Pedicularis*: how do congeners with shared pollinators minimize reproductive interference?. *New Phytologist* **199**: 858–865.
- Jesson LK, Barrett SCH. 2003. The comparative biology of mirror-image flowers. *International Journal of Sciences* **164(5 Suppl.)**: 237-249.
- Junqueira C. N., Hogendoorn K., Augusto S. C. 2012. The use of trap-nests to manage Carpenter bees (Hymenoptera: Apidae: Xylocopini), pollinators of Passion fruit (Passifloraceae: *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). *Ann. Entomol. Soc. Am* **105(6)**: 884-889.
- Junqueira C. N., Rabelo L. S., Bastos, E. M. A. F., Augusto, S. C. 2017. Do flexible pollen foraging habits of *Xylocopa frontalis* (Apidae, Xylocopini) contribute to nest management in passion fruit crops? *Journal of Apicultural Research* **56(5)**: 646- 652.
- Kaluza, B. F., Wallace, H., Keller, A., Heard, T. A., Jeffers, B.; Drescher, N.; Blüthgen, N.; Leonhardt, S. D. 2017. Generalist social bees maximize diversity intake in plant species-rich and resource-abundant environments. *Ecosphere* **8(3)**.
- Kleijn *et al.*, 2015. Delivery of crop pollination services is an insufficient argument for wild pollinator conservation. *Nature Communications* (6).
- Knauer AC, Schiestl FP. 2014. Bees use honest floral signals as indicators of reward when visiting flowers. *Ecology Letters* **18 (2)**: 135– 143.
- Knauer AC, Schiestl FP. 2015. Bees use honest floral signals as indicators of reward when visiting flowers. *Ecology Letters*, **18**: 135–143.
- Knauer AC, Kokko H, Schiestl FP. 2021. **Data from:** Pollinator behaviour and resource limitation maintain honest floral signalling. Digital Repository of the University of Zürich.
- Kühnel S, Blüthgen N. 2015. High diversity stabilizes the thermal resilience of pollinator communities in intensively managed grasslands. *Nature Communications*, 6, 7989.
- Laporta C. 2005. Floral biology and reproductive system of enantiostylous *Senna corymbosa* (Caesalpiniaceae). *Revista de Biología Tropical* **53 (1-2)**: 49-61.
- Lunau K, Piorek V, Krohn O, Pacini E. 2014. Just spines-mechanical defense of malvaceous pollen against collection by corbiculate bees. *Apidologie* **46**: 144-149.

- Luo Z, Zhang D, Renner SS. 2008. Why two kinds of stamens in buzz-pollinated flowers? Experimental support for Darwin's division-of-labour hypothesis. *Functional Ecology* **22**: 794-800.
- Maêda, J. M. 1985. Manual para uso da câmara de Neubauer para contagem de pólen em espécies florais. UFRJ.
- Makino TT, Sakai S. 2007. Experience changes pollinator responses to floral display size: From size-based to reward-based foraging. *Functional Ecology* **21 (5)**: 854- 863.
- Makino TT, Ohashi K. 2017. Honest signals to maintain a long-lasting relationship: Floral colour change prevents plant-level avoidance by experienced pollinators. *Functional Ecology* **31(4)**: 831-837.
- Manente-Balestieri FCDL, Machado VLL. 1999. Entomofauna visitante das flores de *Cassia spectabilis* (L.) D C. (Leguminosae). *An. Soc. Entomol. Brasil* **28(3)**: 429-437.
- Marazzi B, Conti E, Endress PK. 2007. Diversity in anthers and stigmas in the buzz pollinated genus *Senna* (Leguminosae, Cassiinae). *International Journal of Plant Science* **168(4)**: 371–391.
- Marazzi B, Endress PK. 2008. Patterns and development of floral asymmetry in *Senna* (Leguminosae, Cassiinae). *American Journal of Botany* **95**: 22-40.
- Melo LRF, Guimarães BMC, Barônio GJ, Oliveira LC, Cardoso RKO, Araújo TN, Telles FJ. 2018. Como as abelhas percebem as flores e por que isto é importante? *Oecologia Australis* **22(4)**: 362–389.
- Mesquita-Neto JN, Costa BKP, Schlindwein C. 2017. Heteranthery as a solution to the demands for pollen as food and for pollination-legitimate flower visitors reject flowers without feeding anthers. *Plant Biology* **19**: 942-950.
- Mesquita-Neto JN, Vieira ALC, Schlindwein C 2021. Minimum size threshold of visiting bees of a buzz-pollinated plant species: consequences for pollination efficiency. *American Journal of Botany* **108(6)**: 1006–1015.
- Moore CJ, Pannell JR. 2011. Sexual selection in plants. **21(5)**: 176-182.

Mitchell RJ, Karron J.D, Holmquist KG, Bell JM. 2004. The influence of *Mimulus ringens* floral display size on pollinator visitation patterns. *Functional Ecology* **18**: 116–124.

Mitchell RJ, Irwin RE, Flanagan RJ, Karron JD. 2009. Ecology and evolution of plant–pollinator interactions. *Annals of Botany* **103(9)**: 1355–1363.

Nascimento E, Del-Claro K. 2007. Floral visitors of *Chamaecrista debilis* (Vogel) IRWIN & BARNEYBY (Fabaceae – Caesalpinioideae) at cerrado of estação ecológica de Jataí, São Paulo State, Brasil. *Neotropical Entomology* **36(4)**: 619- 624.

Olito C, Abbott JK, Jordan CY. 2018. The interaction between sex-specific selection and local adaptation in species without separate sexes. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **373**.

Oliveira ACS, Souza JT, Brito VLG, Almeida NM. 2021. Attraction of florivores and larcenists and interaction between antagonists in *Senna rugosa* (Fabaceae). *Arthropod-Plant Interactions* **15**: 535–544.

Gómez JM, Bosch J, Perfectti F, Fernandez JD, Abdelaziz M, Camacho JPM. 2008. Association between floral traits and rewards in *Erysimum mediohispanicum* (Brassicaceae). *Annals of Botany* **101(9)**: 1413– 1420.

Ortiz PL, Fernández-Díaz O, Pereja D, Escuredo M, Arista M. 2020. Do visual traits honestly signal floral rewards at community level? *Functional Ecology* **35 (10)**.

Paterno GB, Silveira CL, Kollmann J, Westoby M, Fonseca C R. 2020. The maleness of larger angiosperm flowers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **117 (20)**: 10921 - 10926

Pinheiro M, Gaglianone MC, Nunes CEP, Sigrist MR. 2014. Polinização por abelhas. In: Rech, A. R.; Agostini, K.; Machado, I. C. S.; Oliveira, P. E. A. M. (orgs.). *Biologia da polinização*. Projeto Cultural, Rio de Janeiro, p. 226-264.

Ruedenauer FA, Spaethe J, Leonhardt, SD. 2015. How to know which food is good for you: bumblebees use taste to discriminate between different concentrations of food differing in nutrient content. *J. Exp. Biol.* **218**: 2233–2240.

Russell AL, Golden, RE, Leonard, AS, Papaj, DR. 2015. Bees learn preferences for plant species that offer only pollen as a reward. *Behav. Ecol. Arv* **213**.

Russel A. L., Sanders, S. R., Wilson, L. A., Papaj, D. R. 2021. The size of it: Scant evidence that flower size variation affects deception in intersexual floral mimicry. *Frontiers in Ecology and Evolution* **9**.

Ramos SE, Schiestl, FP. 2020. Evolution of Floral Fragrance is Compromised by Herbivory. *Frontiers in Ecology and Evolution* **8 (30)**: 1-8.

Saab GS, Mansano VF, Nogueira A, Maia IC, Bergamo PJ, Paulinho, JV. 2021. A sophisticated case of division of labour in the trimorphic stamens of the *Cassia fistula* (Leguminosae) flower. *AoB PLANTS*, **13(5)**.

Solís-Montero L, Vallejo-Marín M. 2017. Does the morphological fit between flowers and pollinators affect pollen deposition? An experimental test in a buzz pollinated species with anther dimorphism. *Ecology and Evolution* **7**: 2706–2715.

Souza IM, Coutinho K, Funch LS. 2012. Estratégias fenológicas de *Senna cana* (Nees & Mart.) H.S. Irwin & Barneby (Fabaceae: Caesalpinioideae) como mecanismo eficiente para atração de polinizadores. *Acta Botanica Brasílica* **26 (2)**: 435-443.

Silberbauer-Gottsberger I, Gottsberger G. 1988. A polinização de plantas do Cerrado. *Rev. Bras. Biol.* 48: 651-663.

Silva DF, Pio, R, Nogueira PV, Silva PAO, Figueiredo AL. 2017. Viabilidade polínica e quantificação de grãos de pólen em espécies de fisális. *Revista Ciência Agronômica* **48(2)**: 365-373.

Studer A, Nusbaumer L, Spichiger R. Biodiversidade da Reserva Biológica de Pedra Talhada. Genève, 1-818, 2015.

Schaefer HM, Schaefer V, Levey DJ. 2004. How plant-animal interactions signal new insights in communication. *Trends in Ecology & Evolution* **19(11)**: 577– 584.

Schiestl FP; Johnson SD. 2013. Pollinator-mediated evolution of floral signals. *Trends in Ecology & Evolution* **28(5)**: 307-315.

Sun S, Leshowitz MI, Rychtář J. 2018. The signalling game between plants and pollinators. *Scientific Reports* 8(1) 66-86.

Toji T., Ishimoto N., Nakase Y., Hattori M., Itino T. 2021. Intraspecific convergence of floral size correlates with pollinator size on different mountains: a case study of a bumblebee-pollinated *Lamium* (Lamiaceae) flowers in Japan. *BMC Ecology and Evolution* **21**(64).

Toledo, CAP, Bígio, N.C, Paz JRL. 2020. Revisão sobre a seleção sexual em plantas. *Oecologia Australis* **24**(1): 25-44.

Vallejo-Marín M, Rausher MD. 2007a. Selection through female fitness helps to explain the maintenance of male flowers. *The American Naturalist* 169 (5): 563-568.

Vallejo-Marín M., Rausher, MD. 2007b. The role of male flowers in andromonoecious species: energetic costs and siring success in *Solanum carolinense* L. *Evolution* 61(2): 404–412.

Vallejo-Marín M, Manson JS, Thomson JD, Barrett SCH. 2009. Division of labour within flowers: heteranthery, a floral strategy to reconcile contrasting pollen fates. *Journal of Evolutionary Biology* **22**: 828–839.

Vallejo-Marín, M., Da Silva, E. M., Sargent, R. D., & Barrett, S. C. H. 2010. Trait correlates and functional significance of heteranthery in flowering plants. *New Phytologist*, **188**, 418–425.

Vallejo-Marín M, Walker C, Friston-Reilly P, Solís-Montero L, Iqbal B 2014. Recurrent modification of floral morphology in heterantherous *Solanum* reveals a parallel shift in reproductive strategy. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 369.

Vallejo-Marín, B. 2019. Buzz pollination: studying bee vibrations on flowers. *New Phytol* **224**(3):1068-1074.

Velloso MSC, Brito VLG, Caetano APS, Romero R. 2018. Anther specializations related to the division of labor in *Microlicia cordata* (Spreng.) Cham. (Melastomataceae). *Acta Bot. Bras.* **32**(3).

Westerkamp C. 2004. Ricochet pollination in Cassias – and how bees explain enantiostyly. In: MAGALHÃES, F. B.; PEREIRA, J. O. eds. Solitary bees: conservation, rearing and management for pollination. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, p. 225-230.

Koch L, Lunau K, Wester P. 2017. To be on the safe site - Ungroomed spots on the bee's body and their importance for pollination. *PLOS one*.

Wolowski, M, Freitas L. 2010. Sistema reprodutivo e polinização de *Senna multijuga* (Fabaceae) em Mata Atlântica Montana. *Rodriguésia* **61(2)**: 167-179.

Tabela 1: Média  $\pm$  desvio padrão da morfometria dos verticilos florais e área total da corola. (**AP**: Anteras de polinização; **AA**: Anteras de alimentação; asterístico indica significância com  $p < 0.0001$ ).

	Área das estruturas (mm <sup>2</sup> )	Porcentagem ocupada na flor (%)	Correlação de Pearson (r)	
			AP	AA
Anteras de Polinização (AP)	6.04 $\pm$ 1.28	2.45 $\pm$ 0.30		
Anteras de Alimentação (AA)	6.52 $\pm$ 1.37	2.64 $\pm$ 0.30	0.90*	
Pétalas (PT)	230.70 $\pm$ 45.00	93.12 $\pm$ 0.79	0.83*	0.80*
Total da flor	247.71 $\pm$ 48.05	100		

Tabela 2: Fatores relacionados ao total de pólen em relação a área das anteras, pétalas e interação entre essas variáveis (**Chisq**: qui-quadrado; **Df**: grau de liberdade; **p**: significância).

	Chisq	Df	p
Tipo de Antera	31.693	2	<0.0001
Área total da flor	7.623	2	0.02212
Tipo de Antera: Área total da flor	0.968	1	0.3252

Tabela 3: Frequência de visitas em 100 horas de observações em indivíduos de *Senna aversiflora*. **RV**: Resultado da visita: Polinizador (P) e Pilhador (PI).

Família / espécie	Abordagens por indivíduo		Quantidade e total de visitas florais		Média de flores visitadas por indivíduo abordado	Desvio Padrão	RV
		(%)		(%)			

*Apidae*

<i>Bombus</i> sp.1 (Swederus, 1787)	11	1.21%	41	1.34%	3.73	3.20	P
<i>Bombus</i> sp.2 (Swederus, 1787)	1	0.11%	1	0.03%	1.00		P
<i>Centris</i> sp.1 (Fabricius, 1804)	8	0.88%	16	0.52%	2.00	1.31	P
<i>Centris</i> sp.2 (Fabricius, 1804)	4	0.44%	5	0.16%	1.25	0.50	P
<i>Eulaema bombiformis</i> (Packard, 1869)	3	0.33%	7	0.23%	2.33	1.15	PI
<i>Melipona quadrifasciata</i> (Lepeletier, 1836)	1	0.11%	1	0.03%	1.00		PI
<i>Melipona subnitida</i> (Ducke, 1910)	1	0.11%	1	0.03%	1.00		PI
<i>Trigona spinipes</i> (Fabricius, 1793)	21	2.31%	34	1.11%	1.62	1.43	P
<i>Xylocopa cearensis</i> (Ducke, 1911)	2	0.22%	4	0.13%	2.00	0.00	P
<i>Xylocopa frontalis</i> (Oliver 1789)	3	0.33%	3	0.10%	1.00	0.00	P
<i>Xylocopa grisescens</i> (Lepeletier, 1841)	778	85.49%	2782	90.74%	3.58	3.49	P
<i>Xylocopa</i> sp1 (Latreille, 1802)	42	4.62%	122	3.98%	2.90	1.99	P

<i>Xylocopa</i> sp2 (Latreille, 1802)	7	0.77%	19	0.62%	2.71	2.56	P
<b>Halictidae</b>							
sp	28	3.08%	30	0.98%	1.07	0.26	PI
Total	910		3066		3.37	3.34	

Tabela 4: Resultado do efeito da área floral e horário na frequência de visitas de *Xylocopa grisescens*, em relação a abordagem por indivíduo e visitas às flores (**Df**: grau de liberdade; **Deviance**: regressão; **Resid. Df**: graus de liberdade residuais; **Resid. Dev**: regressão residual; **p**: significância).

		Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	p	
Abordagens ao indivíduo	Horário	4	205.142	78	346.65	<0.0001	**
	Área total da flor	1	14.479	77	332.17	0.000142	*
	Horário: Área total da flor	4	11.807	73	320.36	0.018844	*
Visitas a flores individuais	Horário	4	900.94	95	2407.4	<0.0001	**
	Horário	1	267.99	94	2139.4	<0.0001	**
	Área total da flor	4	199.82	90	1939.6	<0.0001	**
	Horário: Área total da flor						*

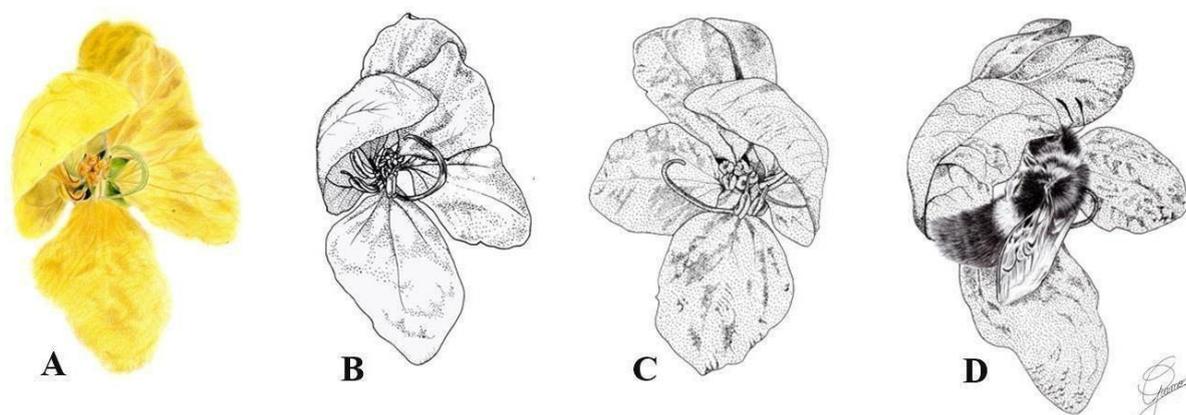


Figura 1: Flores de *Senna aversiflora* demonstrando disposição das estruturas reprodutivas em flores direita (A-B) e esquerda (C), e visita de abelha em uma flor direita (D).

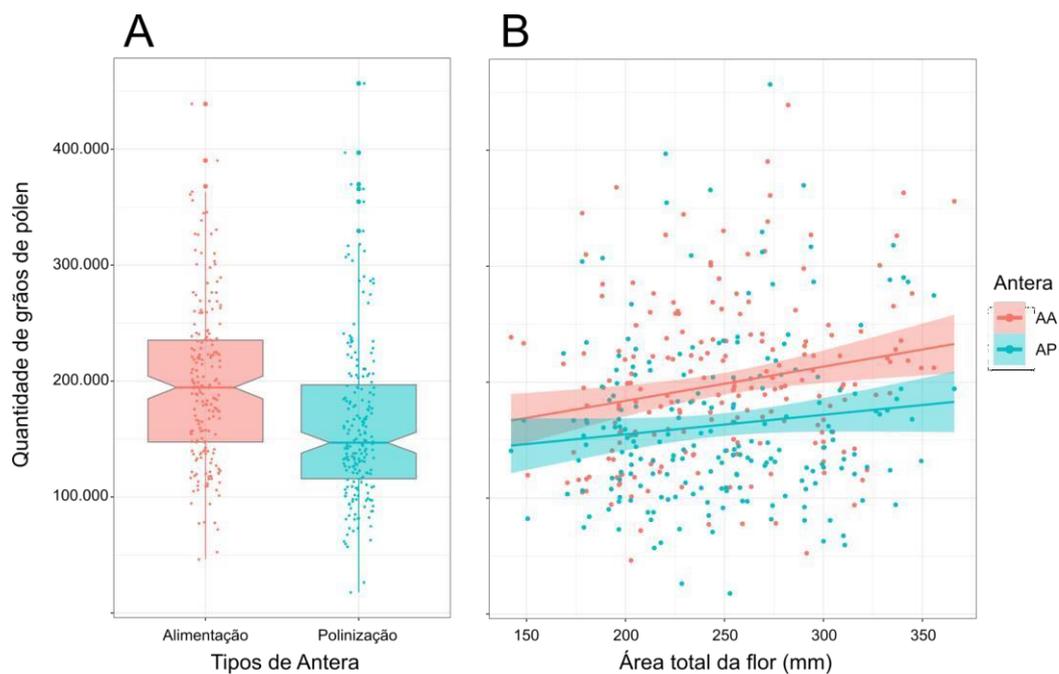


Figura 2: Características florais associadas à quantidade de pólen ofertado por flor em *Senna aversifolia* (Fabaceae). A: Boxplot demonstrando a quantidade de grãos de pólen por tipo de anteras; B: Scatterplot demonstrando a relação entre a área total da flor com a quantidade de pólen ofertado pelas dois tipos de anteras.

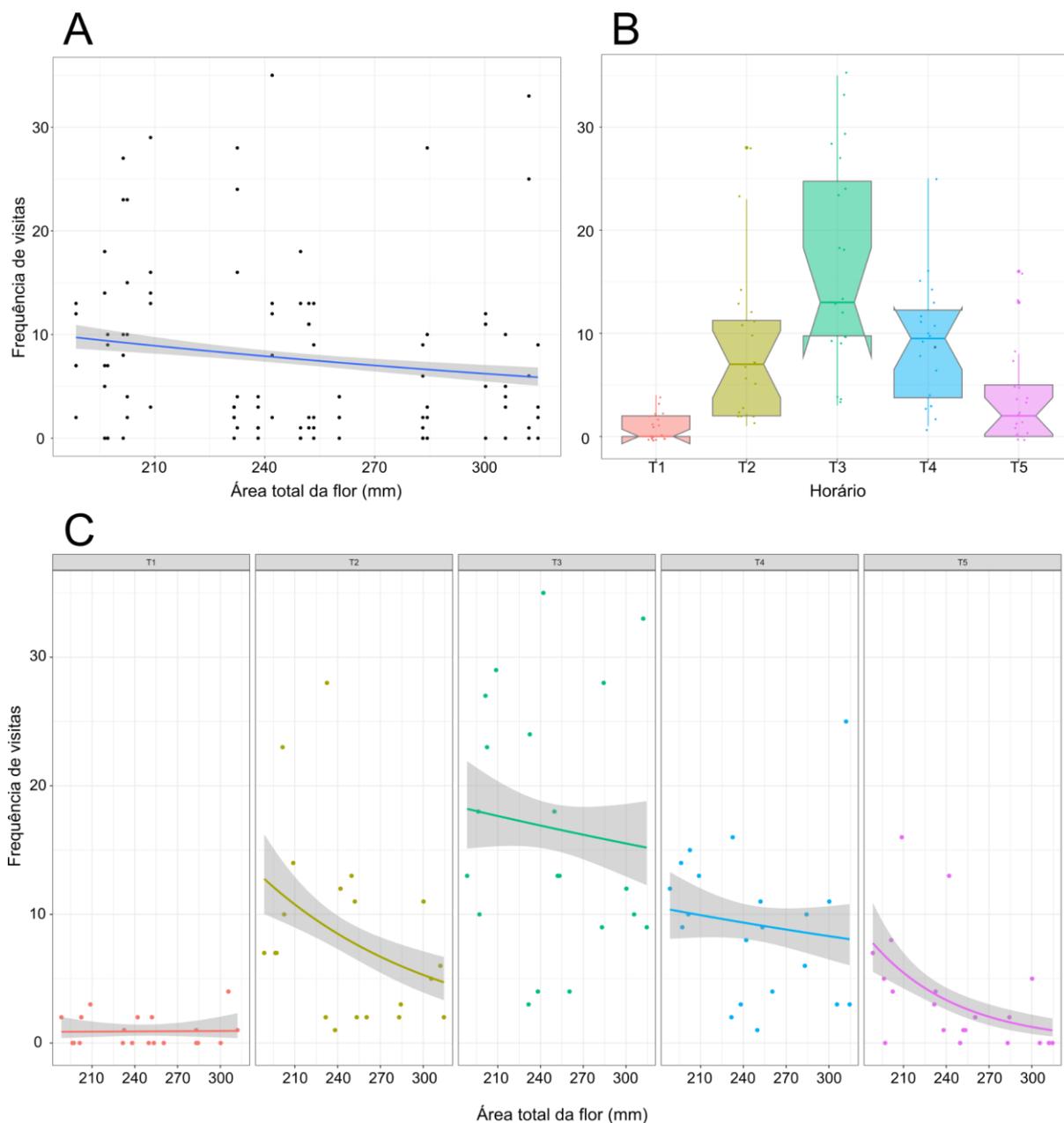


Figura 3. Efeito da área total média das flores por indivíduo sobre a frequência de visitas de *Xylocopa grisescens*. A: Área total média das flores por indivíduo em relação a frequência das visitas; B: Boxplot demonstrando a ocorrência do efeito dos horários em relação a frequência de visitas; C: Frequência de visitas em diferentes horários em relação a área total média das flores por indivíduo (Legenda: **T1**: 7:00-8:00; **T2**: 8:00-9:00; **T3**: 9:00-10:00; **T4**: 10:00-11:00 e **T5**: 11:00-12:00).

## Material suplementar capítulo 1

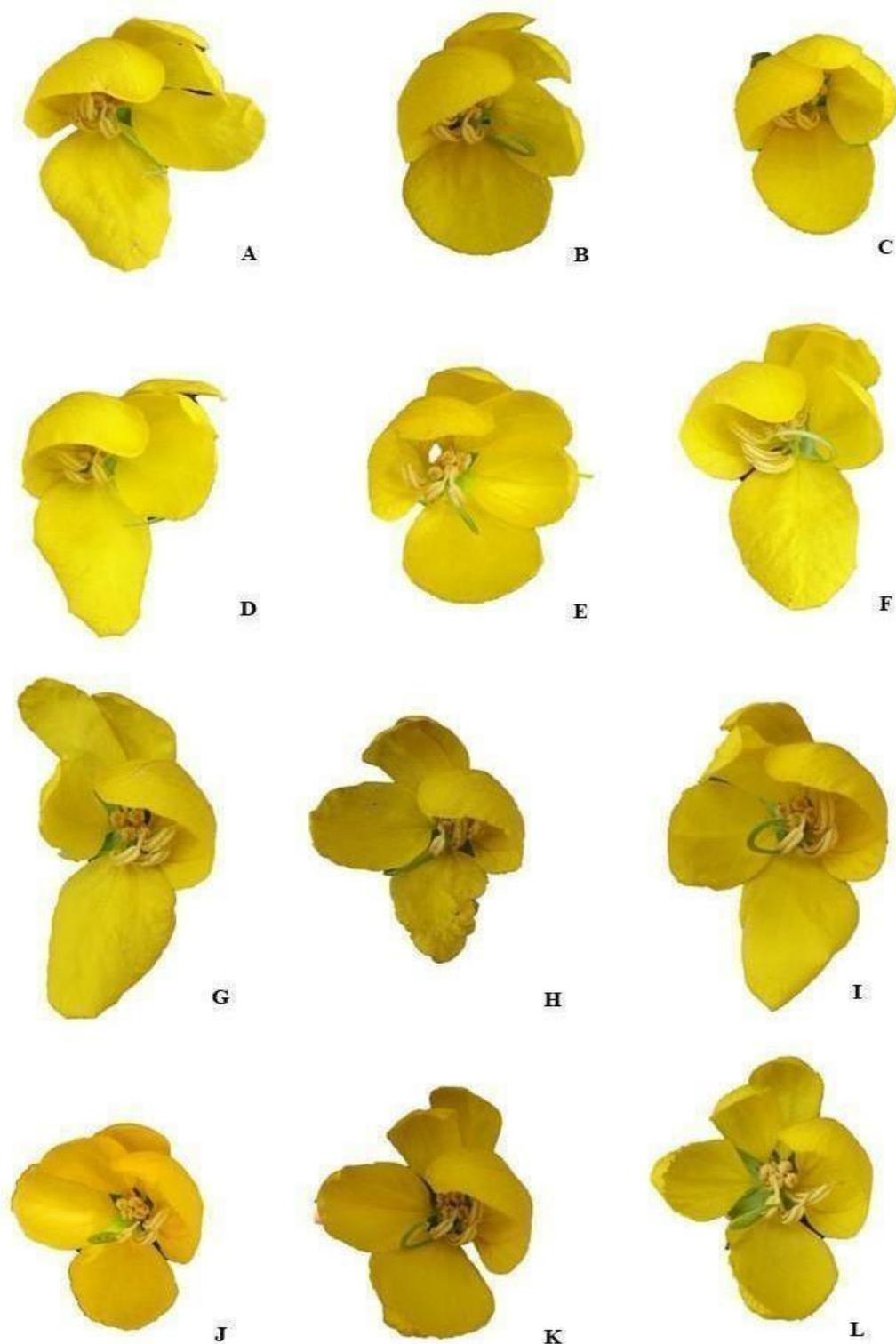


Figura suplementar 1. Flores da espécie *Senna aversiflora* mostrando androceu heterântero (anteras de alimentação e anteras de polinização); exibindo a pétala curvada e posicionamento do gineceu em ambos os morfos florais. A-F: Morfo direito; G-L: Morfo esquerdo.

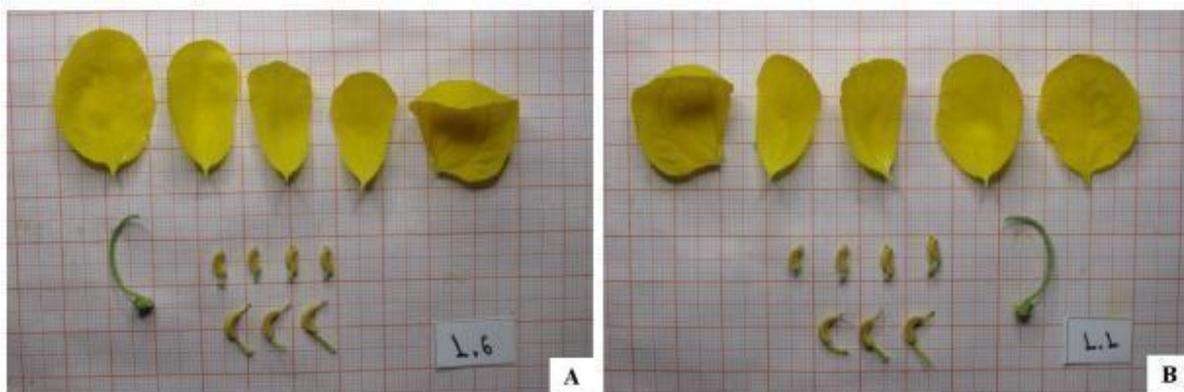


Figura suplementar 2. Flores desmembradas do morfo esquerdo (A) e direito (B).

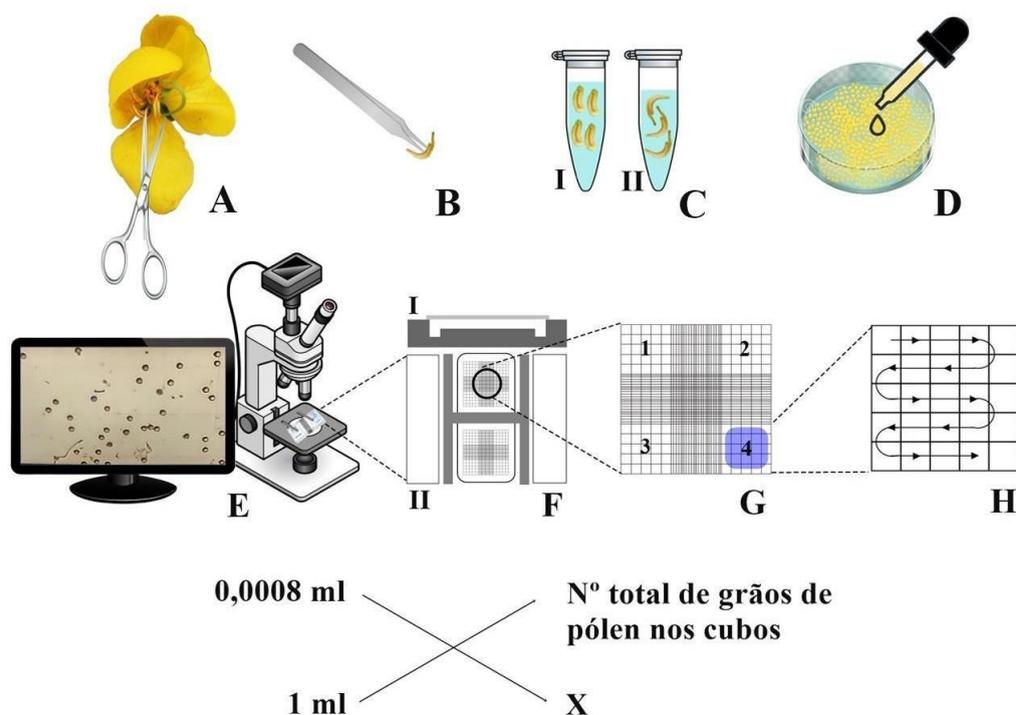


Figura suplementar 3. Contagem de grãos de pólen com a câmara de Neubauer. A: Remoção da anteras da flor de *Senna aversiflora*; B: Armazenamento da antera com auxílio de pinça em tubo de Eppendorf; C: Anteras armazenadas em tubos de Eppendorf com álcool 70% (C1: anteras de alimentação, CII: anteras de polinização); D: Grãos de pólen homogeneizado em 1 ml da solução de ácido glicerinado; E: Visualização de grãos de pólen em Câmara de Neubauer com o auxílio de câmera acoplada ao microscópio óptico; F: Visualização da malha e dos quadrantes da Câmara de Neubauer (FI: vista lateral da Câmara de Neubauer; FII: vista frontal); G: Grade de contagem; H: Contagem em zigue-zague dos grãos de pólen contido nos setores do quadrante. I: Cálculo para obtenção da estimativa de grãos de pólen produzido por antera.

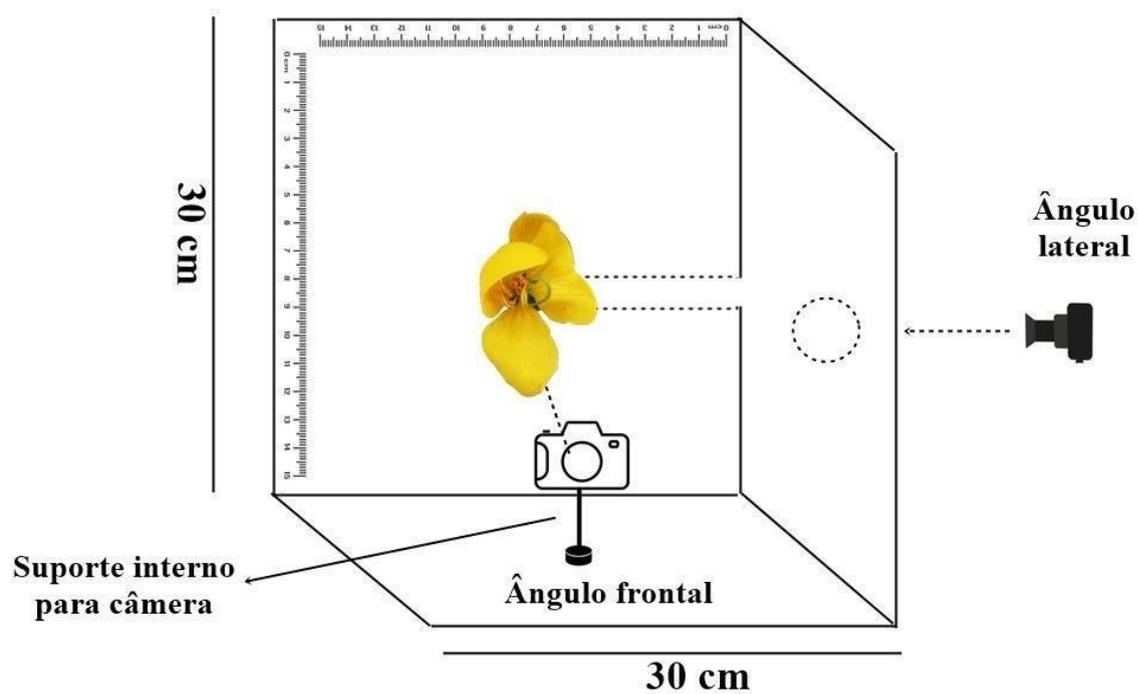


Figura suplementar 4. Modelo em 2D do estúdio fotográfico adaptado para obtenção de imagens em campo das flores de *Senna aversiflora*.



Figura suplementar 5. Algumas das principais abelhas polinizadoras das flores de *Senna aversiflora* presentes no município de Quebrangulo, Alagoas, Brasil. A, B, D, F: *Xylocopa grisescens* realizando coleta vibrátil de pólen; C e E: Aproximação de *Xylocopa grisescens* (Lepeletier, 1841) à flor. G, H, I: *Xylocopa* sp1 realizando coleta vibrátil de pólen.

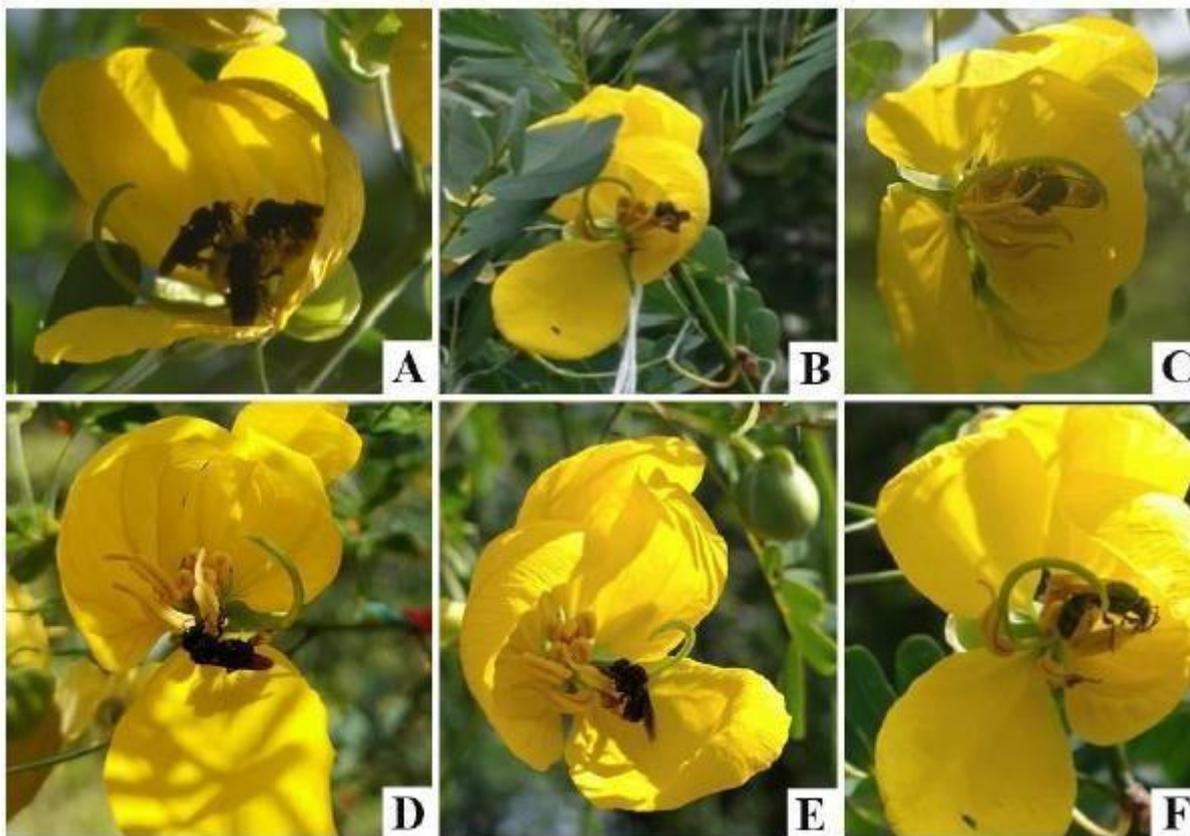


Figura suplementar 6. Espécies de abelhas pilhadoras em flores de *Senna aversiflora*. A, D, E: *Trigona spinipes* Fabricius (1793) mastigando antera para retirada de pólen, causando danos as anteras; B, C, F: Halictidae posicionada no ápice da antera promovendo vibração para a coleta de pólen.

Tabela suplementar 1. Medidas do comprimento corporal das abelhas visitantes de *Senna aversiflora*.

Família	Espécie	Variação no comprimento corporal (mm)
Apidae	<i>Xylocopa grisescens</i> (Lepelletier, 1841)	30 a 37.87
Apidae	<i>Xylocopa frontalis</i> (Oliver, 1789)	30 a 36
Apidae	<i>Xylocopa</i> sp1 (Latreille, 1802)	28.7 a 34.26
Apidae	<i>Xylocopa</i> sp2 (Latreille, 1802)	18.3 a 21.14
Apidae	<i>Xylocopa cearensis</i> (Ducke, 1911)	18.76 a 22.75

Apidae	<i>Eulaema bombiformis</i> (Packard, 1869)	22.33 a 27.38
Apidae	<i>Bombus</i> sp.1 (Swederus, 1787)	20 a 27.1
Apidae	<i>Bombus</i> sp.2 (Swederus, 1787)	15 a 16.22
Apidae	<i>Melipona quadrifasciata</i> (Lepeletier, 1836)	9.2 a 11.94
Apidae	<i>Melipona subnitida</i> (Ducke, 1910)	8.4 a 10.64
Apidae	<i>Centris</i> sp.1 (Fabricius, 1804)	15.4 a 16.2
Apidae	<i>Centris</i> sp.2 (Fabricius, 1804)	16.2 a 18.11
Halictidae	sp1	8 a 12
Halictidae	sp2	8 a 10.2
Apidae	<i>Trigona spinipes</i> (Fabricius, 1793)	8 a 10

---

## **Capítulo 2**

**Interação entre variação morfológica floral e diferentes polinizadores afeta a transferência de pólen promovendo relaxamento da enantiostilia: um experimento com simulacros de abelhas**

**Manuscrito a ser submetido ao periódico: NEW PHYTOLOGIST**

**Qualis: A1**

**Fator de Impacto: 10.323**

## **Interação entre variação morfológica floral e diferentes polinizadores afeta a transferência de pólen promovendo relaxamento da enantiostilia: um experimento com simulacros de abelhas**

Charlane Moura da Silva<sup>1</sup>; Camila Chagas Correia<sup>2</sup>; Natan Messias de Almeida<sup>3</sup>; Arthur Domingos de Melo<sup>4</sup>; Isabel Cristina Machado<sup>5</sup>

<sup>1</sup> ORCID: 0000-0003-4405-4556; Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal – PPGBV, Departamento de Botânica, Laboratório de Biologia Floral e Reprodutiva – POLINIZAR, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife, PE, Brasil.

<sup>2</sup> ORCID: 0000-0002-9626-5673; Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal – PPGBV, Departamento de Botânica, Laboratório de Citogenética e Evolução Vegetal – CITOVEGETAL, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife, PE, Brasil.

<sup>3</sup> ORCID: 0000-0003-1392-7289; Universidade Estadual de Alagoas – UNEAL, *Campus III*, Palmeira dos Índios, AL, Brasil.

<sup>4</sup> ORCID: 0000-0001-6279-5142; Universidade de Pernambuco - UPE, Campus de Petrolina, PE, Brasil.

<sup>5</sup> ORCID: 0000-0001-5015-2393; Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal – PPGBV, Departamento de Botânica, Laboratório de Biologia Floral e Reprodutiva – POLINIZAR, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife, PE, Brasil.

### **RESUMO**

O gênero *Senna* (Fabaceae) possui flores enantiostílicas, que se caracterizam por uma variação morfológica, na qual duas formas florais se distinguem quanto a deflexão do estilete para direita ou esquerda em relação ao eixo floral. Esse polimorfismo é afetado pela variação fenotípica intraespecífica, influenciando o encaixe morfológico das abelhas polinizadoras durante a coleta de pólen. Nesse contexto, o presente estudo busca analisar tais efeitos, verificando i) quais as fontes de variação do fenótipo floral; ii) como ocorre a deposição/captação de pólen em diferentes espécies de abelhas; e iii) como a morfologia floral afeta a eficiência de transferência de pólen em diferentes abelhas. Nós utilizamos como modelo *Senna aversiflora*, espécie que apresenta enantiostilia monomórfica e flores com anteras poricidas dependentes de abelhas que vibram para a liberação dos grãos de pólen. O estudo foi realizado na ReBio de Pedra Talhada-AL, remanescente de Mata Atlântica. Mensuramos o fenótipo floral por meio de imagens digitais. Realizamos simulações de visitas, utilizando simulacros reproduzindo a morfologia corporal dos principais gêneros de abelhas polinizadoras e sonificador para verificar a deposição e captação de pólen. A espécie apresentou ampla variação no posicionamento das estruturas florais (gineceu, pétala curvada e anteras) em relação ao distanciamento horizontal, vertical e de profundidade. Embora essa variação seja explicada principalmente pelos diferentes morfos, detectamos certa sobreposição entre os posicionamentos das estruturas reprodutivas de flores direitas e esquerdas. Nossos experimentos mostraram que a deposição e captação de pólen diferem entre as abelhas e as partes de seus corpos. Apenas a deposição de pólen foi determinada pelos morfos florais. Também demonstramos que tanto a forma como a variação na morfologia floral influenciam a efetividade na transferência de pólen, que pode diferir fortemente entre as espécies de abelha.

**Palavras-chave:** Mecanismos reprodutivos; Cassiinae; Hercogamia recíproca; polinização por vibração.

## ABSTRACT

The genus *Senna* Mill. (Fabaceae) has enantiostyle flowers, which are characterized by a morphological variation, in which two floral forms are distinguished in terms of style deflection to the right or left in relation to the floral axis. This polymorphism is affected by intraspecific phenotypic variation, influencing the morphological fit of pollinating bees during pollen collection. In this context, the present study seeks to analyze such effects, verifying i) which are the sources of variation in the floral phenotype; ii) how pollen deposition/uptake occurs in different bee species; and iii) how floral morphology affects pollen transfer efficiency in different bees. We used as a model *Senna aversiflora* (Herb.) H.S.Irwin & Barneby, a species that presents monomorphic enantiostyly, flowers with poricidal anthers dependent on bees that vibrate to release pollen grains. The study was carried out at ReBio de Pedra Talhada-AL, a remnant of the Atlantic Forest. We measured the floral phenotype using digital images. We carried out simulations of visits, using simulacra reproducing the body morphology of the main genera of pollinating bees and sonicator to verify the deposition and capture of pollen. The species showed wide variation in the positioning of floral structures (gynoecium, curved petal and anthers) in relation to horizontal, vertical and depth spacing. Although this variation is mainly explained by the different morphs, we detected some overlap between the positions of the reproductive structures of right and left flowers. Our experiments showed that pollen deposition and uptake differ between bees and their body parts. Only pollen deposition was determined by floral morphs. We also demonstrate that both shape and variation in floral morphology influence the effectiveness of pollen transfer, which can differ strongly between bee species.

**Keywords:** Reproductive mechanisms; Cassiinae; Reciprocal herkogamy; vibration pollination.

## INTRODUÇÃO

A enantiostilia é uma variação morfológica na qual existem duas formas florais que diferem reciprocamente em uma mesma espécie (Barrett, 2002). Tais formas caracterizam-se por apresentarem flores com pistilo curvado para a direita (morfo-D) ou esquerda (morfo-E) do eixo central da flor, formando imagens especulares umas das outras (Barrett, 2002). A enantiostilia pode se apresentar na forma monomórfica (expressa dois morfos florais em um mesmo indivíduo) ou dimórfica (apenas um morfo floral por indivíduo) (Jesson & Barrett, 2003). Em alguns casos, a deflexão dos pistilos orienta-se em eixo oposto em relação às anteras de polinização, onde o morfo D apresenta anteras posicionadas à esquerda e pistilo a direita e o morfo E apresenta anteras direita e pistilo a esquerda (Barrett, 2002; Jesson & Barrett, 2003). Em espécies da subtribo Cassiinae (*Cassia*, *Senna* e *Chamaecrista*) é comum a presença de pétala curvada, que possui a função de auxiliar na deposição de pólen nos corpos dos polinizadores. Assim, quando ocorre a liberação do pólen pela ação vibrátil das abelhas, parte destes que não são depositados diretamente, percorrem a pétala até serem depositados no corpo do visitante (Almeida & Castro, 2019).

As flores enantiostílicas potencializam a transferência polínica entre morfotipos diferentes. Isso se dá pelo posicionamento recíproco das estruturas sexuais, favorecendo a ocorrência do fluxo polínico intermorfo, no qual flores esquerdas depositam pólen do lado direito do corpo do visitante e o estigma capta no lado esquerdo, sendo o inverso para flores direitas (Barrett, 2002). Essa condição resulta em maiores taxas de xenogamia, embora exista a possibilidade de geitonogamia em espécies monomórficas (Barrett, 2002; Jesson & Barrett, 2003). Trabalhos com espécies da subtribo Cassiinae (Fabaceae) abordam variações nos mecanismos reprodutivos (Jesson & Barrett, 2002), especialização de estruturas na deposição de pólen (Westerkamp, 2004; Laporta, 2005), dinâmica reprodutiva (Costa *et al.*, 2007; Gómez, 2008; Dutra, 2009) e morfofuncionalidade de espécies enantiostílicas (Almeida *et al.*, 2013a; 2015a; 2018; Amorim *et al.*, 2019; Morais *et al.*, 2019; Braga *et al.*, 2022). Ainda assim, existem lacunas em relação aos mecanismos que medeiam os processos que levam a redução da geitonogamia e sobre a funcionalidade da enantiostilia monomórfica em promover a xenogamia (Jesson & Barrett, 2003; Almeida & Castro, 2019; Morais *et al.*, 2019).

Espécies enantiostílicas da subtribo Cassiinae podem diferir entre si em relação às posições das estruturas reprodutivas (Almeida *et al.*, 2013b; 2015a), o que permite que diferentes espécies explorem locais específicos (lado esquerdo ou direito no dorso ou ventre dos visitantes) de deposição e captação de pólen no corpo dos polinizadores (Almeida *et al.*,

2015b, Almeida; Castro, 2019). A variação nos locais de deposição de pólen no corpo das abelhas ocorre em algumas espécies da subtribo Cassiinae nas quais a pétala côncava apresenta função de auxiliar na deposição de pólen de forma indireta no corpo do polinizador (Westerkamp, 2004; Almeida *et al.*, 2013b; 2015a, b).

Além disso, uma mesma espécie pode interagir com uma guilda de visitantes florais diversa. Assim, os locais de deposição podem variar em decorrência de diferentes combinações entre morfologia floral e o comportamento e morfologia do visitante (Almeida *et al.*, 2015a, b). Estes diferentes ajustes entre flor e polinizador podem em alguns casos otimizar a reprodução das plantas. Neste contexto, o estudo teve como objetivo avaliar a variação morfológica em flores de *Senna aversiflora* (Herb.) H.S.Irwin & Barneby e a influência dela nos locais de deposição e captação de pólen no corpo dos diferentes visitantes florais. Para isso, testamos então a hipótese de que a variação nos posicionamentos das estruturas reprodutivas promove a ocorrência de diferentes locais de deposição e captação de pólen no corpo dos diferentes visitantes.

## **METODOLOGIA**

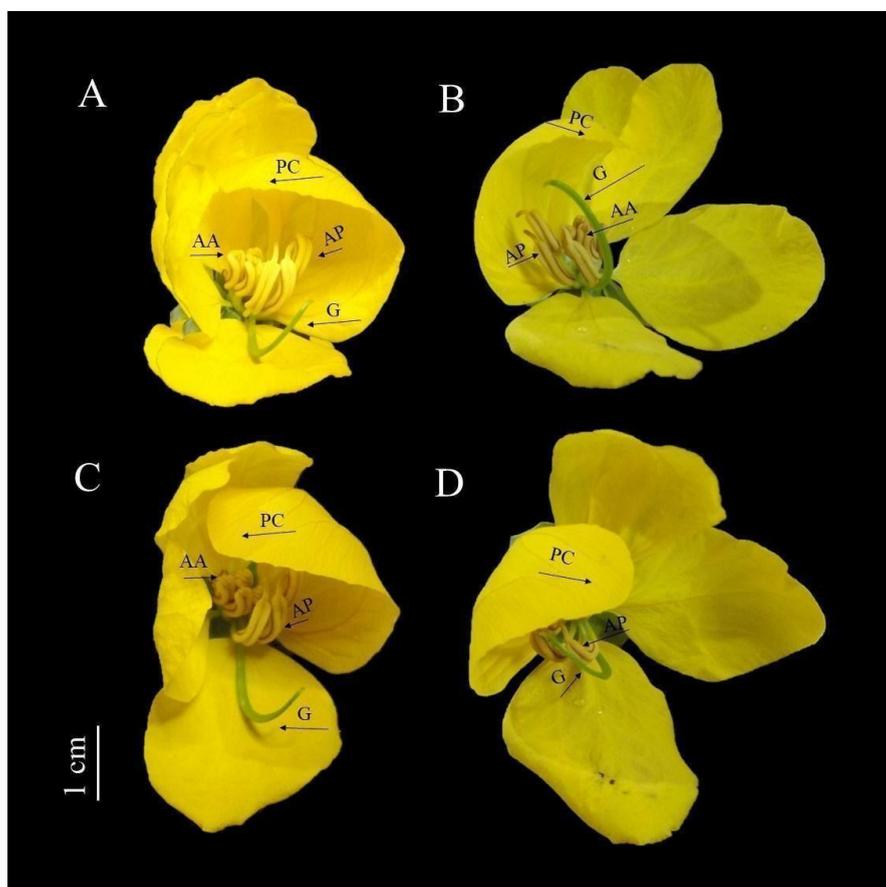
### **Local de estudo**

O estudo foi realizado nos entornos da Reserva Biológica de Pedra Talhada, um remanescente de Mata Atlântica, localizada entre os estados de Pernambuco e Alagoas, nordeste do Brasil, entre as coordenadas 9°13'40.81"S e 36°25'39.62"O. Esta unidade de conservação, administrada pelo ICMBio de Alagoas, ocupa uma área de 4.469ha, com relevo acidentado, variando entre 459m e 883m, abrangendo parte dos municípios de Lagoa do Ouro em Pernambuco, Quebrangulo e Chã Preta em Alagoas (Studer; Nusbaumer; Spichiger, 2015).

### **Espécie estudada**

*Senna aversiflora* (Figura 1) possui enantioestilia monomórfica, apresentando hábito arbustivo, flores assimétricas com pétalas amarelas, sendo uma delas curvada (chamada de *cucullus*), ligeiramente maior que as outras. Suas flores apresentam heteranteria, com estames diferindo em relação ao tamanho e a função. O estigma possui base estipitada e ápice puntiforme, bem como anteras poricidas que necessitam de vibração para liberação dos grãos, sendo este o único recurso floral oferecido aos polinizadores (Marazzi *et al.*, 2007, 2008). Na área de estudo, pode ser encontrada em áreas de vegetação arbustiva esparsa, borda e clareiras de mata, sobre solos argilosos e areno-argilosos, entre 380 e 650 metros de altitude. O período

de floração da espécie na área de estudo se estende pelos meses de agosto a outubro, enquanto a frutificação ocorre entre outubro e novembro.



**Fig. 1** (A-B) Detalhes da morfologia floral de *Senna aversiflora* na Reserva Biológica de Pedra Talhada – Alagoas, Brasil. Visão frontal (A-B) e superior (C-D) do morfo esquerdo (A-C) e direito (B-D). Abreviaturas: pétala curvada (PC), anteras de alimentação (AA), anteras de polinização (AP), gineceu (G).

### Indivíduos amostrados

Ao todo, 36 indivíduos de *S. aversiflora* foram marcados conforme as disponibilidade e distribuição das plantas na área, os quais foram acompanhados durante o estudo. Para cada indivíduo coletamos 10 flores ( $n= 360$ ), sendo cinco para cada morfo floral. Cada flor foi previamente coberta com saco de tecido “voil” a fim de impedir que sofressem qualquer tipo de dano (Oliveira *et al.*, 2021), e que o pólen fosse removido das anteras por visitas prévias.

### Modelo dos simulacros das abelhas

Os simulacros de abelhas criados foram baseados nos tamanhos corporais dos quatro principais gêneros polinizadores da espécie na área de estudo (ver capítulo 1 com frequência de visitas), incluindo o tamanho de seus pêlos. As abelhas foram coletadas e tiveram seu tamanho

corporal mensurado com auxílio do paquímetro MTX com graduação até 150 mm (Tabela 1). Foram confeccionados quatro modelos: i) S-X (baseado no tamanho morfológico das espécies de *Xylocopa grisescens*); ii) S-E (baseado no tamanho morfológico da espécie de *Eulaema bombiformis*); iii) S-B (baseado no tamanho morfológico das espécies de *Bombus*) e iv) S-C (baseado no tamanho morfológico das espécies de *Centris*). Estes foram feitos em biscuit preto, um material que permite a devida adesão e fácil visualização do pólen. Optamos pelo uso de simulacros em vez das próprias abelhas, pois nosso objetivo era realizar uma grande quantidade de repetições sem que houvesse a necessidade de sacrificarmos um elevado número de insetos. O corpo de cada um dos modelos de abelha foi dividido em 16 partes (Fig 3-B; adaptado de Tong & Huang, 2018).

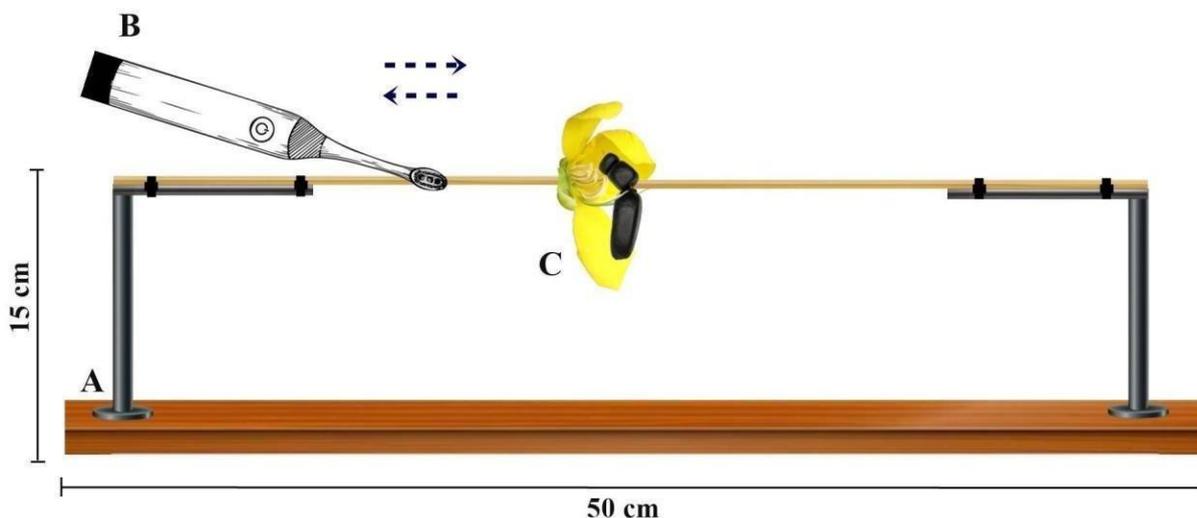
**Tabela 1.** Medidas do comprimento corporal das abelhas e tamanho dos simulacros.

Família	Espécie	Variação no comprimento corporal (mm)	Tamanho do simulacro (mm)
Apidae	<i>Xylocopa grisescens</i> (Lepeletier, 1841)	30 a 37.87	35.7
Apidae	<i>Eulaema bombiformis</i> (Packard, 1869)	22.33 a 27.38	26.42
Apidae	<i>Bombus</i> sp.1 (Swederus, 1787)	20 a 27.1	25.3
Apidae	<i>Centris</i> sp.2 (Fabricius, 1804)	16.2 a 18.11	17.65

### Simulações de visitas

Para simularmos a vibração da abelha no momento da visita, utilizamos o método aperfeiçoado por Amorim *et al.* (2017), onde foram utilizadas escovas de dente elétricas (sonicador) com frequências que representam a faixa de vibração semelhantes à das abelhas (172,7-324,1Hz) (Burkart *et al.*, 2011). Para este estudo foi utilizada a escova de dente elétrica Philips Sonycare. Para a realização deste experimento, confeccionamos uma base de madeira com 50×12 cm e 5 cm de altura, tendo duas estruturas de metal posicionadas em cada extremidade (15 cm de altura e 10 cm de base para apoiar o palito de madeira de 20 e 15 cm) para a fixação das abelhas e das flores e ambas fixadas em uma haste de madeira. Para simulação (Figura 2), a abelha foi posicionada na estrutura floral, de acordo com comportamento de visitas previamente observados em campo, e a haste de suporte das flores

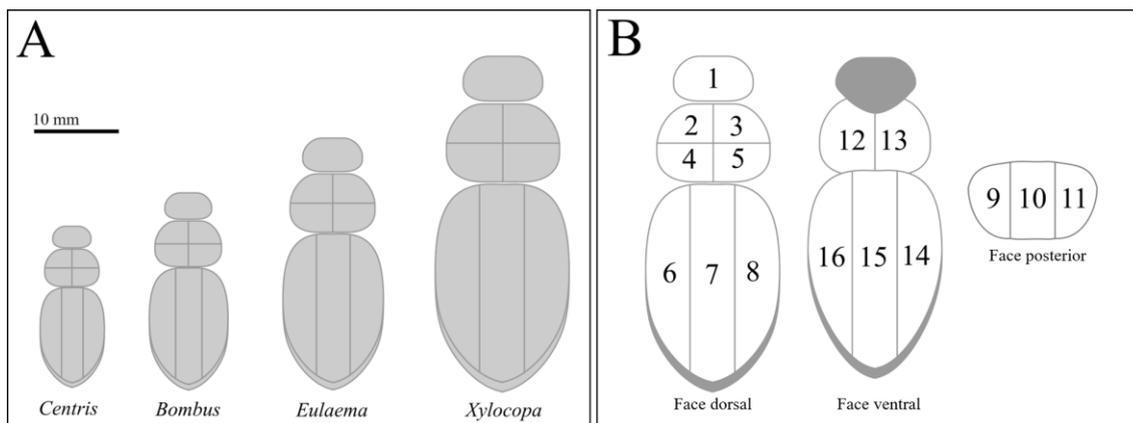
foi posteriormente vibrada. Foram feitas filmagens no ângulo frontal para analisar (frame a frame) o deslocamento horizontal e vertical do estigma em relação ao eixo floral. Os experimentos foram realizados de agosto a novembro de 2021, totalizando 1432 simulações, sendo quatro simulações por flor uma para cada modelo de simulacro.



**Fig. 2** Simulador de visitas em laboratório. (A) Hastes de suporte para abelha e flor; (B) Sonicador tocando a haste de fixação da flor para transmitir a vibração; (C) Abelha em biscuit posicionada na estrutura floral.

### Locais de deposição e captação de pólen

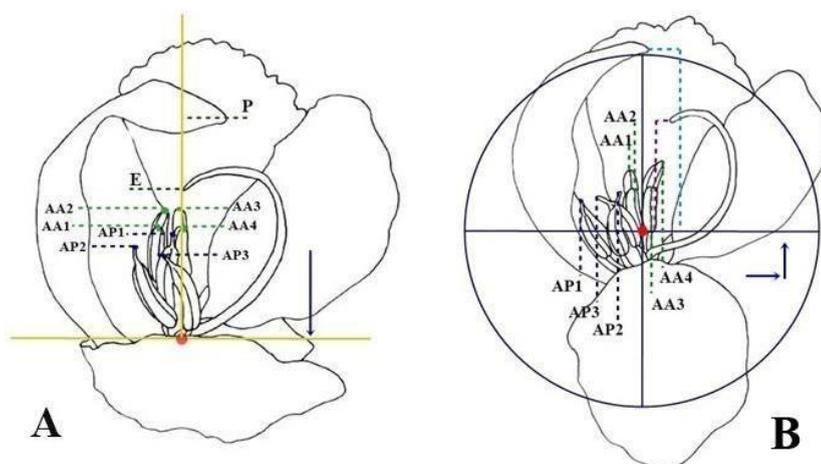
A investigação dos locais de deposição e captação de pólen foi realizada com base nas simulações de visitas em laboratório. Registramos a presença e ausência de contato do estigma nas diferentes partes dos simulacros em duas condições: estigma estático (verificado logo após o posicionamento da abelha na flor) e durante a vibração (verificado a partir de observação direta e das filmagens). Contudo, como não houve diferença nas condições, por isso mantivemos as análises apenas na do estigma durante a vibração. Após cada simulação, as abelhas foram analisadas quanto a presença e ausência de pólen nas diferentes partes dos simulacros (figura 3), gerando posteriormente *heatmaps* para otimização da visualização dos dados.



**Fig. 3** (A) Formato e tamanho dos diferentes simulacros em vista dorsal. (B) Vistas das faces dorsal, ventral, e posterior do corpo do simulacro ilustrando as áreas consideradas para averiguação do contato do estigma e deposição de pólen (adaptado de Tong & Huang, 2018).

### Morfometria floral

Para a morfometria, avaliamos as fotos das flores utilizadas nas simulações realizadas. Os registros foram feitos com escala, distância e posicionamento padronizados (frontal e superior – Figura 1) para a mensuração da localização das estruturas reprodutivas em relação ao eixo central da flor (em flores direitas e esquerdas). Realizamos as medições em 358 flores de *S. aversiflora*. Nelas, mensuramos o afastamento horizontal, vertical em relação ao centro da flor e profundidade dos diferentes estames, da posição estigma e da pétala curvada em relação ao centro da flor (Figura 4). As três medidas obtidas são relevantes ao ajuste morfológico das flores no momento da deposição e captação de pólen no corpo polinizador. Tais medidas foram obtidas através do software ImageJ 5.0 (Soft Imaging System GmbH, Munster, Germany).



**Figura 4.** Representação das marcações para morfometria das estruturas florais de *Senna aversiflora* para mensuração da profundidade (A), afastamento horizontal e vertical (B). AA é

a designação para anteras de alimentação, AP para anteras de polinização, E para estigma e P para pétala curvada.

### **Análise dos dados**

A fim de determinar quais as fontes que possuem maior variação no fenótipo das flores, nós estimamos a partição de variância para cada um de seus componentes hierárquicos: variação entre indivíduos ( $n=36$ ), variação entre morfos ( $n=2$ ) e variação dentro de cada morfo ( $n=10$ ). A variação foi analisada para a posição da pétala curvada, do estigma e para os dois conjuntos de anteras (4 de alimentação e 3 de polinização), separadamente, o que possibilitou analisar também a variação intrafloral das anteras. Fizemos isso usando Modelos Lineares Mistos (LMMs) para cada uma das medidas obtidas, a partir do qual testamos diferenças significativas de cada nível comparados com os modelos aninhados através da estimativa de máxima verossimilhança restrita. Essas análises foram realizadas com o pacote lme4 (Bates *et al.*, 2015). Todas as análises deste estudo foram feitas utilizando software R (R Core Team, 2021). Por incluirmos o morfo como variável preditora na análise anterior, tornou-se possível verificar também o quanto cada atributo morfológico difere entre os morfos de forma univariada. Para isso, realizamos uma MANOVA, de modo que foram utilizadas as médias das medidas morfológicas relacionadas às anteras a fim de obter uma única medida por flor (indicativo do ponto central entre cada um dos tipos de anteras). As diferenças entre morfos foram visualizadas através de uma PCA. Essas análises foram realizadas com o pacote vegan (Oksanen *et al.*, 2022) e factoextra (Kassambara & Mundt, 2020).

Realizamos diferentes abordagens a fim de determinar as diferenças entre os modelos de abelhas em relação a deposição de pólen e contato do estigma. Considerando que em nosso experimento esses eventos representaram uma variável binária (0/1), tentamos a princípio ajustar modelos GLMM com distribuição binomial e quasibinomial. Neles, inserimos como variáveis explicativas o morfo floral, a abelha, e a parte do corpo da abelha. Como variável resposta consideramos o sucesso ou insucesso de deposição de pólen/contato do estigma. Como variáveis aleatórias, inserimos os indivíduos de onde foram provenientes as flores. Uma vez que tais modelos foram super dispersos, optamos por comparar a frequência total de deposição de pólen/contato do estigma sobre as partes dos corpos das abelhas através de um GLM com distribuição de erros de Poisson. Nele, inserimos como variáveis explicativas o morfo floral, a abelha, e a parte do corpo da abelha e como variável resposta a frequência total de pólen/contato do estigma em cada parte do corpo da abelha. Essas análises foram realizadas com o pacote lme4 (Bates *et al.*, 2015).

Também visualizamos a probabilidade de fluxo intra e intermorfo em cada parte do corpo das abelhas através de uma estimativa calculada como  $F=(DP/N) \cdot (CE/N)$ . Onde **F** representa a estimativa do fluxo, **DP** representa a frequência de deposição de pólen em uma dada parte do corpo da abelha, **CE** representa a frequência de contato do estigma nessa mesma parte do corpo, e **N** representa o número de repetições do experimento.

Finalmente, determinamos como a variação na morfologia floral afeta a efetividade de polinização. Como variável explicativa, utilizamos os scores dos dois primeiros eixos da PCA indicativo da morfologia floral. Como variável resposta, utilizamos a somatória dos valores de estimativa de fluxo (valor F) das diferentes partes do corpo da abelha onde o estigma da flor foi capaz de tocar, como indicativo da eficiência de polinização. Uma vez que a presença de diferentes morfos assume a ocorrência de relações complexas, optamos por testar o efeito entre essas variáveis através de GAM, realizados separadamente para cada um dos modelos de abelha. Essas análises foram realizadas com o pacote mgc (Wood, 2017).

## RESULTADOS

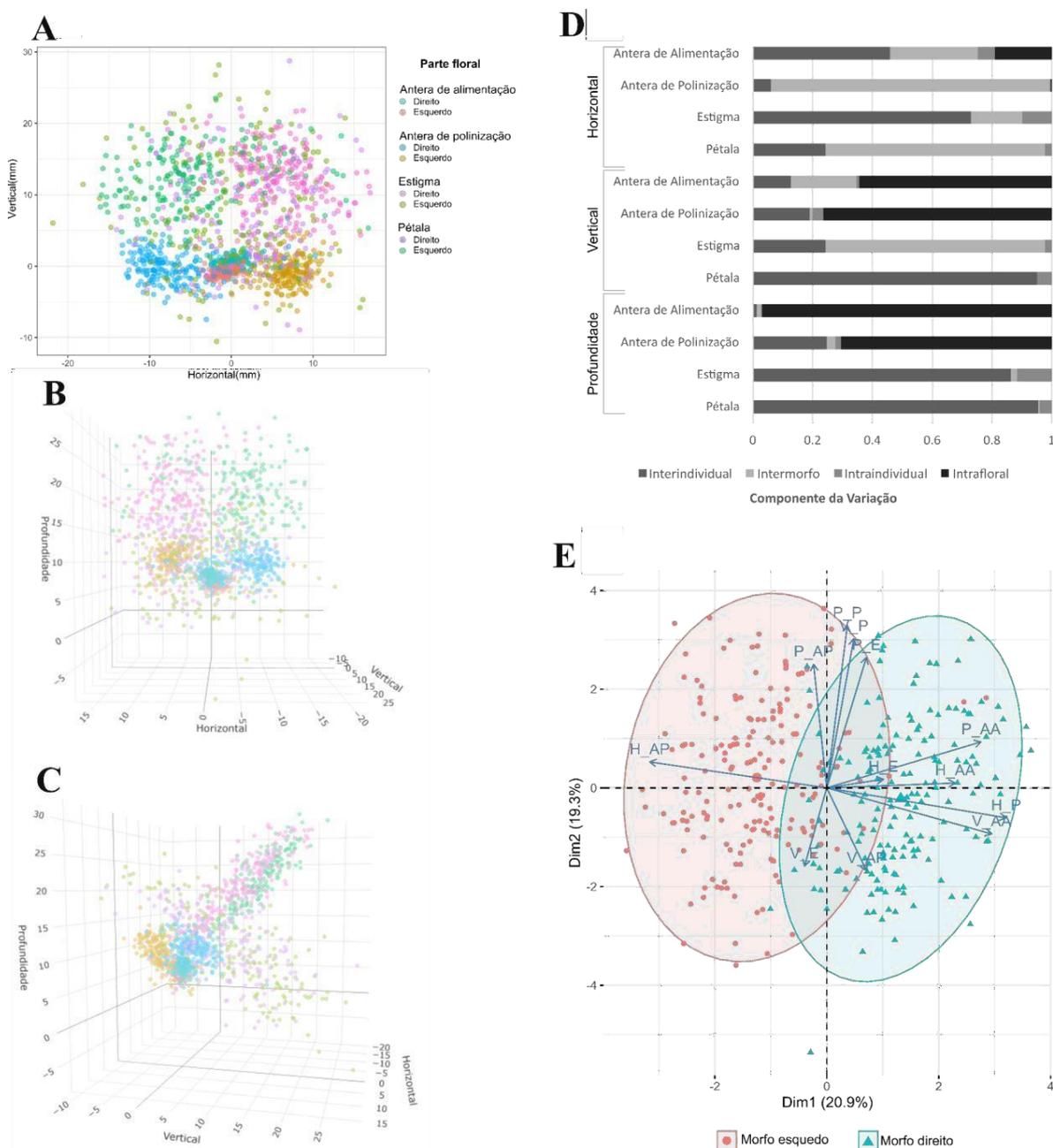
### Varição morfológica em flores de *Senna aversiflora*

As dimensões das estruturas florais da espécie estudada variaram amplamente, tanto em termos de distanciamento horizontal, quanto vertical e de profundidade (Figura 5: A-C), resultando em uma marcada diferença dos posicionamentos das estruturas reprodutivas entre os morfos florais. A partição dos componentes de variação em termos univariados indicou que entre os caracteres florais mensurados, a distância horizontal da pétala, antera de polinização e distanciamento vertical do estigma foram os que mais variaram entre morfos (Figura 5:D). Com relação a variação interindividual, as medidas e estruturas que mais variaram foram o distanciamento horizontal do estigma, posição vertical da pétala e profundidade da pétala e do estigma (Figura 5:D).

Ao serem considerados em termos multivariados, as dimensões florais mensuradas foram diferentes entre ambos os morfos (Wilks=0.139; F=177.68; p<0.0001), excetuando-se apenas a profundidade do estigma (P=0.15) e da pétala curvada (P=0,41), bem como distanciamento vertical do estigma (P=0,30) e da pétala curvada (P=0,99). Por sua vez, as demais aferições diferiram significativamente entre os morfos, com destaque para o afastamento vertical, havendo variação entre morfos para todos os órgãos (Tabela 2). Essa distinção pôde ser claramente visualizada através da análise de PCA, na qual foi possível retratar 42% da variação dos dados, sendo PCA1=20,9% e PCA2=19,3%. Os atributos mais

correlacionados com a PCA1 foram o posicionamento horizontal da pétala curvada (0.48) e a antera de alimentação (-0.47; Tabela 2). Assim como a antera de polinização (0.39), estigma (0.41) e pétala curvada (0.51) em relação a profundidade, na correlação com a PCA2 (Tabela 2). Bem como, o posicionamento vertical da pétala, a segunda com maior correlação em PC2, com 0.47. As medidas de profundidade demonstraram maior correlação com PCA2 (Fig. 5- E).

Embora seja possível observar uma separação visual na posição das estruturas florais entre os morfos, há um conjunto de flores que ocupam o mesmo morfoespaço em relação aos posicionamentos das suas estruturas, demonstrando uma certa sobreposição entre os morfos.



**Fig. 5.** Variação morfológica em flores de *Senna aversiflora*. (A) No gráfico de dispersão os pontos demonstram o posicionamento das estruturas florais com base nas medidas de distanciamento horizontal e vertical; (B-C) Gráficos de dispersão tridimensional das três medidas (horizontal, vertical e profundidade) mensuradas nas estruturas florais (Anteras de alimentação, antera de polinização, estigma e pétala); (D) Componentes da variação morfológicas estimados através de Modelos Lineares Mistos (LMM); (E) Gráfico da análise de componente principal (PCA) demonstrando as contribuições das variáveis de acordo com as dimensões florais dos morfos direito e esquerdo ao longo dos dois eixos 1 e 2.

**Tabela 2:** Resultados da Mensuração horizontal, vertical e profundidade das partes florais. São indicados a Média  $\pm$  desvio padrão (sd) dos morfos, bem como os valores de correlação com os dois primeiros eixos da PCA, e os resultados obtidos na MANOVA.

Orientação	Parte floral	Média $\pm$ sd	Média $\pm$ sd	Correlação com os componentes principais da PCA		Diferença entre os morfos (MANOVA)		
				PC1	PC2	F	P	
Horizontal	Antera de Alimentação	0.63 $\pm$ 1.39	-0.07 $\pm$ 1.45	0.34	0.02	21.79	<0.0001	***
	Antera de Polinização	6.75 $\pm$ 2.77	-7.26 $\pm$ 4.26	-0.47	0.08	1376.30	<0.0001	***
	Estigma	0.01 $\pm$ 6.98	2.40 $\pm$ 6.24	0.15	0.03	11.66	<0.0001	***
	Pétala	-4.55 $\pm$ 6.81	5.64 $\pm$ 4.73	0.48	-0.09	267.50	<0.0001	***
Vertical	Antera de Alimentação	0.02 $\pm$ 1.49	-0.16 $\pm$ 1.35	0.44	-0.15	131.14	<0.0001	***
	Antera de Polinização	-0.70 $\pm$ 2.04	-0.23 $\pm$ 2.07	0.11	-0.26	4.52	0.03	*
	Estigma	8.73 $\pm$ 7.92	7.92 $\pm$ 6.63	-0.06	-0.25	1.08	0.30	
	Pétala	12.28 $\pm$ 3.89	12.27 $\pm$ 4.19	0.07	0.47	0.00	0.99	
Profundidade	Antera de Alimentação	9.86 $\pm$ 1.50	9.78 $\pm$ 1.61	0.41	0.15	86.52	<0.0001	***
	Antera de Polinização	10.58 $\pm$ 2.17	9.80 $\pm$ 2.09	-0.04	0.39	11.97	<0.0001	***
	Estigma	10.93 $\pm$ 6.44	11.83 $\pm$ 5.19	0.11	0.41	2.08	0.15	
	Pétala	21.69 $\pm$ 4.38	21.30 $\pm$ 4.50	0.06	0.51	0.67	0.41	

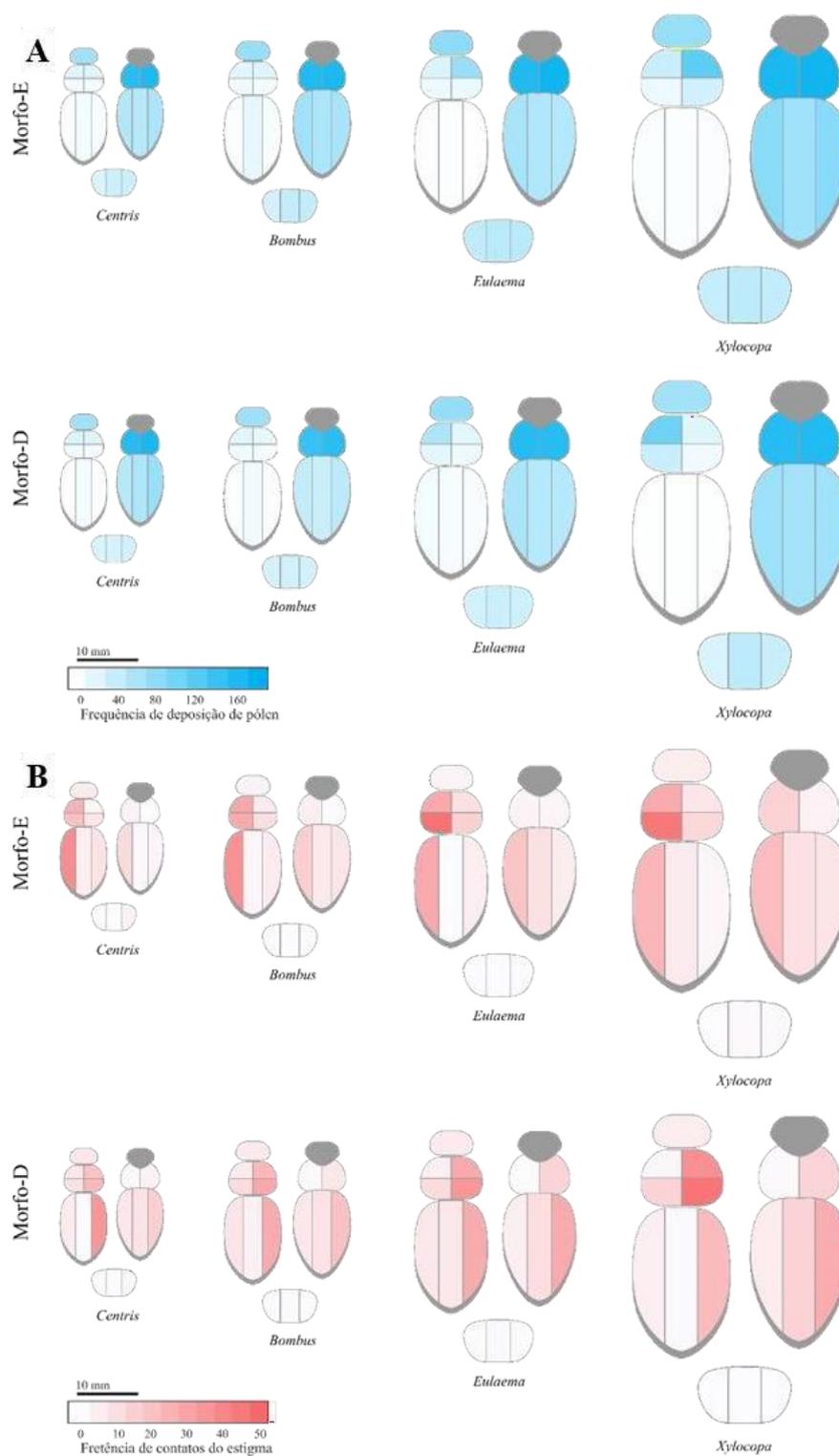
### Dinâmica de deposição e captação de pólen

A frequência de deposição de pólen foi influenciada pelo morfo floral, pela espécie de abelha e pelo local de deposição em seus corpos. Também detectamos efeitos de interação entre os fatores, que demonstram que a frequência de deposição de pólen difere entre os locais dos corpos das abelhas em função da espécie de abelha, e que essa relação é influenciada também pelo morfo floral (Tabela 3).

Tais diferenças ficaram evidentes a partir da inspeção visual dos *heatmaps* que retratam os locais de deposição de pólen (Figura 6: A). Neles, considerando a parte dorsal das abelhas, verificamos que nas flores do morfo esquerdo os grãos de pólen ficavam aderidos em maiores frequências no lado direito do tórax e na cabeça, principalmente para S-X e S-E (sendo o inverso para flores direitas; Figura 6: A). A deposição na parte ventral do tórax e abdômen se apresentou de forma bastante semelhante e com alta frequência de deposição para todas os modelos de abelhas, o que se deve provavelmente à deposição de pólen diretamente a partir das anteras de alimentação. Já a deposição de pólen na parte ventral do abdômen apresentou maior frequência no morfo esquerdo, principalmente no modelo S-X. Quanto às espécies de abelhas, os modelos de abelhas maiores, S-X e S-E, apresentaram maior similaridade no padrão de deposição de pólen em ambos os morfos, tanto na parte dorsal quanto na parte ventral do corpo. Os dois modelos de abelhas menores, S-B e S-C, apresentaram maiores similaridades entre elas. A deposição de pólen na cabeça ocorreu de forma semelhante entre os quatro modelos de abelhas (Figura 6: A).

Já em relação ao contato com o estigma (Figura 6:B), os experimentos revelaram que houve diferença significativa na frequência desse evento em relação a espécie de abelha e local do corpo. Contudo, o morfo floral não tem um efeito sobre o contato com o estigma, ou seja, os estigmas de ambos os morfos tocam em uma frequência similar no corpo das abelhas. De fato, o morfo floral teve um efeito apenas na frequência de contato com o estigma em função da parte do corpo da abelha, como indicado pelo efeito significativo de interação entre essas variáveis. Detectamos ainda uma interação significativa que indica que a frequência de contato do estigma difere entre os locais do corpo em função das espécies de abelhas (Tabela 3).

Um padrão inverso ao de deposição de pólen, considerando o mesmo morfo, foi encontrado para o contato com os estigmas. Em relação à espécie de abelha, houve maior frequência de contato do estigma em S-X e S-E do que em S-B e S-C. Ao analisar se o tipo de abelha influenciava no local de contato do estigma no corpo da abelha, verificamos que em S-B e S-C há maior contato do estigma na lateral direita (em flores direitas) ou esquerda (em flores esquerdas) do abdômen. Já em S-X e S-E há maior contato do estigma na parte dorsal posterior direita (em flores direitas) ou esquerda (em flores esquerdas) do tórax. O toque do estigma na parte ventral ocorreu de forma similar para os modelos, mas tendo um maior contato do lado direito para flores do morfo D e o inverso para o morfo oposto, apresentando uma maior frequência para S-X e S-E (Figura 6:B).

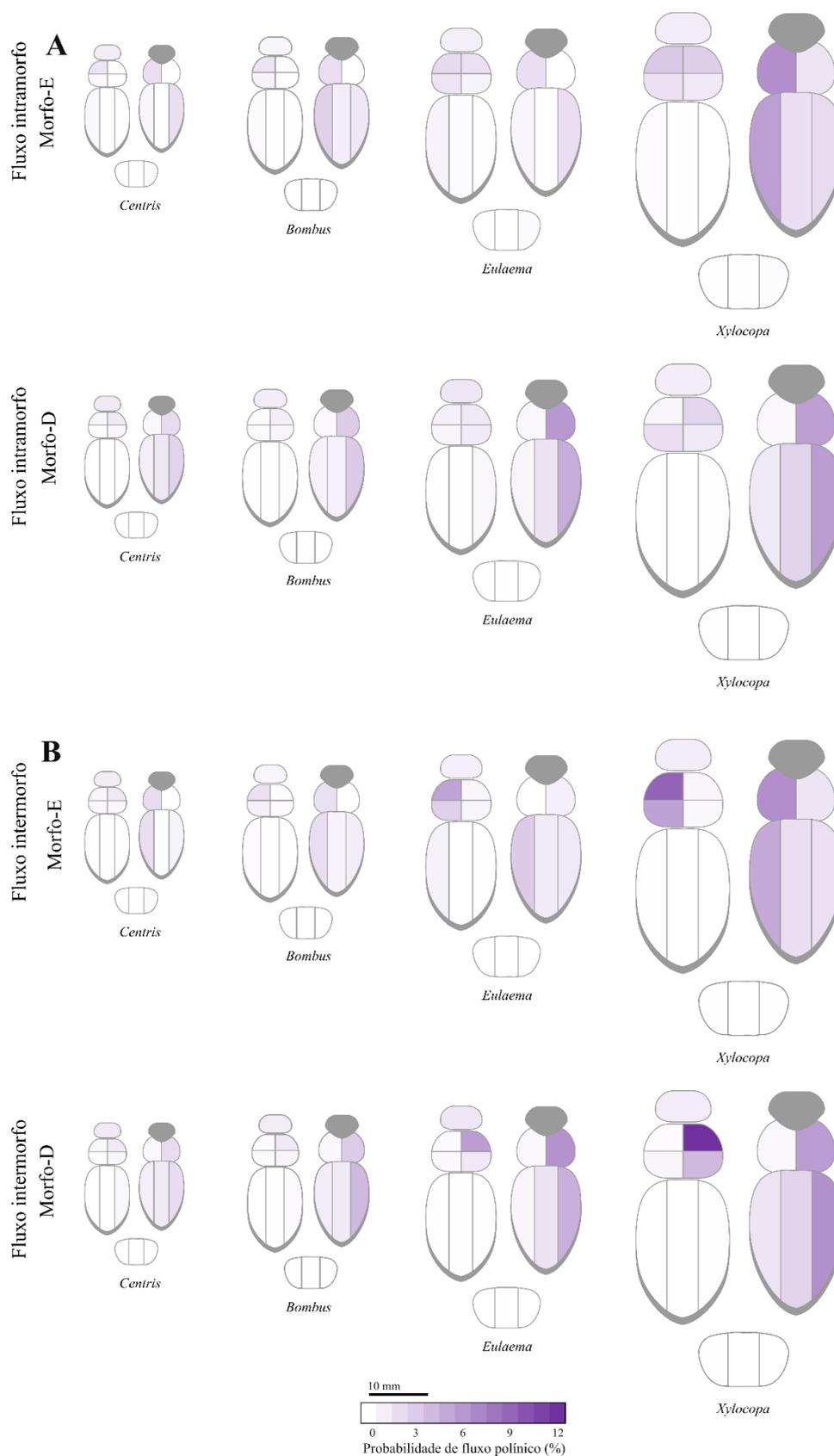


**Fig. 6** Heatmaps mostrando os hotspots na frequência de deposição de pólen (A) e contato do estigma (B) das flores de *Senna aversiflora* (Fabaceae) sobre os diferentes simulacros de abelhas polinizadoras.

**Tabela 3:** Efeitos do morfo floral (M), da espécie (EA) e da parte do corpo da abelha (PA) sobre a frequência de deposição de pólen e contato do estigma de *Senna aversiflora* (Fabaceae), determinados a partir de Modelos Lineares Generalizados com distribuição de erros de Poisson (**Df:** grau de liberdade; **Deviance:** regressão; **Resid. Df:** graus de liberdade residuais; **Resid. Dev:** regressão residual; **p:** significância).

	Variável	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	p	
Deposição de pólen	M	1	12.6	126	5205.2	0.0003	***
	EA	3	67.4	123	5137.8	< 0.00001	***
	PA	15	4753.4	108	384.4	< 0.00001	***
	M: EA	3	7	105	377.4	0.071	.
	M: PA	15	127.3	90	250	< 0.00001	***
	EA: PA	45	182.4	45	67.7	< 0.00001	***
	M: EA: PA	45	67.7	0	0	0.016	*
Contato do estigma	M	1	0.07	126	1352.02	0.79	
	EA	3	26.73	123	1325.29	< 0.00001	***
	PA	15	778.76	108	546.53	< 0.00001	***
	M: EA	3	0.36	105	546.17	0.94	
	M: PA	15	420.49	90	125.68	< 0.00001	***
	EA: PA	45	73.12	45	52.56	0.005	**
	M: EA: PA	45	52.56	0	0	0.20	

As estimativas da probabilidade da ocorrência do fluxo de pólen intra e intermorfo nos quatro modelos de abelhas indicam que esse fluxo varia amplamente entre os gêneros de abelhas (Figura 7). De modo geral, os modelos S-C e S-B possuem baixa probabilidade de fluxo intra e intermorfo (Figura 7). Existe uma maior possibilidade de ocorrência de fluxo intermorfo do que intramorfo nos modelos S-E e S-X (Figura 7). No entanto, *Xylocopa* é o modelo que tem maiores chances de promover fluxo de pólen intermorfo, principalmente na frontal do tórax, direito ou esquerdo, dependendo do morfo considerado.

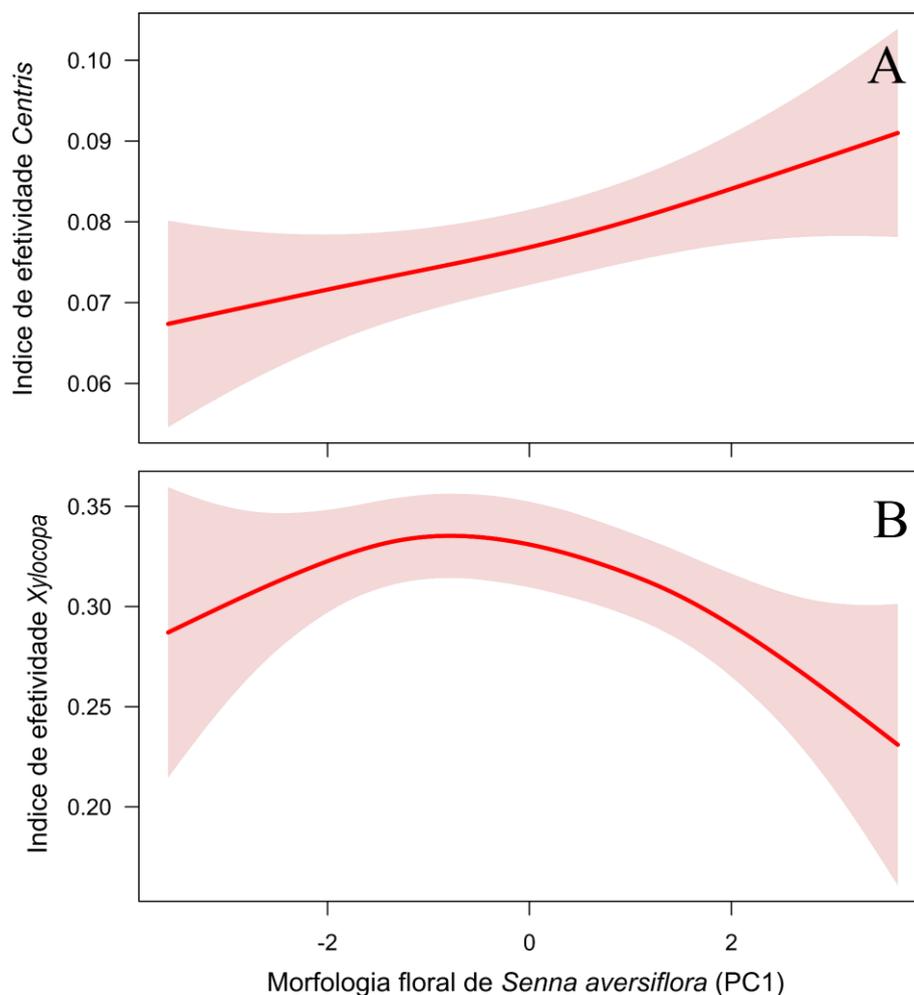


**Fig 7** Heatmap com a probabilidade de fluxo polínico nos modelos das abelhas polinizadoras avaliados em flores de *Senna aversiflora*: Fluxo intramorfo (A) e intermorfo (B).

### **Efeito da variação morfológica na eficiência de deposição e captação**

Ao mensurar o efeito da morfologia floral sobre a eficiência de polinização nas diferentes espécies, verificamos que tal relação se deu de forma diferente para cada abelha. Nos modelos de S-B e S-E não houve qualquer efeito da morfologia floral sobre a eficiência de polinização (Tabela 4). Já para as abelhas S-X e S-C essa relação foi estatisticamente significativa (Tabela 4), embora apenas em relação ao PC1 e cada uma das abelhas estabelecendo um tipo de relação diferente (Tabela 4).

Em *Centris* detectamos uma relação direta e positiva entre o índice de efetividade e PC1 (Fig 8:A), já em *Xylocopa*, detectamos uma relação quadrática negativa entre o índice de efetividade e PC1 (Fig 8: B). Isso sugere que *Xylocopa* é mais eficiente em flores que, independentemente de pertencerem ao morfo esquerdo ou direito, possuem estruturas reprodutivas em posições intermediárias no centro da flor (ver interseção entre os morfos na figura Fig 5: E). Em ambos os casos, a ausência de uma relação significativa com PC2 sugere que a profundidade de pétalas e estruturas reprodutivas não deve influenciar na efetividade da polinização.



**Fig. 8** Cenários demonstrando o efeito da morfologia floral em flores de *Senna aversiflora* em relação ao índice de efetividade nas abelhas *Centris* (A) e *Xylocopa* (B). A linha de regressão linear está expressa em tom de vermelho.

**Tabela 4:** Verificação da significância do efeito da morfologia floral em flores de *Senna aversiflora* em relação ao índice de efetividade nos quatro modelos de abelhas, para os dois primeiros Componentes Principais da PCA. (**F**: estimativa do fluxo; **p**: significância).

Espécies de abelha	PC	F	p	
<i>Bombus</i>	s(PC1)	1.677	0.15	
	s(PC2)	0.359	0.54	
<i>Centris</i>	s(PC1)	3.223	0.03	*
	s(PC2)	1.846	0.17	
<i>Eulaema</i>	s(PC1)	0.95	0.33	
	s(PC2)	0.052	0.81	
<i>Xylocopa</i>	s(PC1)	3.046	0.02	*
	s(PC2)	1.779	0.18	

## DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstraram uma significativa e ampla variação no posicionamento das estruturas florais em ambos os morfos, embora grande parte dessa variação também pode ser atribuída às diferenças intra e interindividuais, e no caso das anteras até mesmo intrafloral. Adicionalmente, identificamos a presença de flores com posicionamento intermediário nas estruturas reprodutivas. Concomitantemente, nossos experimentos mostraram que os locais de deposição de pólen nas abelhas são determinados pelo morfo floral, espécie de abelha e local do corpo, com a deposição ocorrendo principalmente na porção do tórax e cabeça. Já o contato do estigma é afetado pela espécie de abelha e local do corpo, mas surpreendentemente há pouca influência do morfo floral. Nossos dados sugerem um maior fluxo de pólen intermorfo do que intramorfo. Por fim, vimos que em conjunto, a morfologia floral pode afetar a eficiência de diferentes abelhas, mas isso só ocorreu em S-X e S-C com respostas diferentes. Abaixo discutimos essas variações e possíveis influências nas interações com as abelhas.

### **Variação morfológica em flores de *Senna aversiflora***

Nossos resultados retratam que os caracteres morfológicos, se mostraram típicos para o gênero *Senna* (Gottsberger & Silberbauer-Gottsberger, 1988; Owens & Lewis, 1989; Endress, 1994; Marazzi *et al.*, 2006; 2007; Marazzi *et al.*, 2008; Almeida *et al.*, 2013a, b; Braga *et al.*, 2022). Mas, a ampla variação presente nas flores, promoveu diferenças entre os morfos, entre indivíduos e dentro da flor, principalmente em relação ao posicionamento horizontal e vertical. Entre os morfos a variação ocorreu no posicionamento da pétala, estigma e antera de polinização. A grande variação intrafloral em comparação aos demais níveis (intraindividual; interindividual) nas anteras de alimentação, pode ser explicada pelo fato destas terem um posicionamento bastante conservado nas flores, mantendo sempre a mesma distância entre si. Este parece ser um padrão que encontramos, sendo este coerente com o que é esperado para a enantioestilia (Almeida *et al.*, 2013b). Já a variação intraindividual foi baixa em relação a interindividual, isso pode ter ocorrido devido a sobreposição dos morfos em alguns indivíduos.

De modo geral a enantioestilia é caracterizada pela ocorrência dos morfos direito e esquerdo (Barrett 2002; Jesson & Barrett 2002; Jesson *et al.*, 2002; Laporta, 2005; Minnar & Anderson, 2021). Entretanto, a espécie estudada apresentou ampla variação morfológica entre as flores, com o posicionamento das estruturas florais ocorrendo de forma intermediária, o que gera sobreposição entre os grupos florais, ainda que ambos se sustentem. Estudos já abordaram a ocorrência de casos atípicos relacionados a enantioestilia em Cassiinae (p.ex. em *Chamaecrista flexuosa*, Almeida *et al.*, 2013b), relatando a ocorrência de um terceiro morfo (central) e de

posicionamento horizontal intermediário do gineceu (Braga *et al.*, 2022) como em *Senna aversiflora*. Esses tipos florais são relacionados às suas morfofuncionalidades (morfo esquerdo, direito e central) podendo dessa forma ampliar a área de captação no corpo dos polinizadores e reduzir a competição dos estigmas por pólen (Almeida *et al.*, 2013b; Braga *et al.*, 2022).

### **Dinâmica de deposição e captação de pólen**

É comum ter diferentes abelhas sendo polinizadoras em flores que apresentam sistema enantiostéfico (Carvalho & Oliveira, 2003; Nascimento & Del-Claro, 2007; Oliveira-Rebouças & Gimenes, 2011; Almeida *et al.*, 2013b; Morais *et al.*, 2020). Neste sentido, nossos dados mostraram que a transferência de pólen ocorreu de forma diferente entre as abelhas e as partes dos seus corpos, e que os locais de deposição de pólen são mais afetados pelo morfo do que os locais de contato com o estigma. Tais observações corroboram estudos que avaliam a dinâmica da deposição e captação de pólen (Kawai & Kudo, 2009; Vallejo-Marín *et al.*, 2009; Almeida *et al.*, 2013a,b; 2015b; Solís-Montero & Vallejo-Marín, 2017), que mostram a diversidade de locais nos quais pode a presença de pólen, o que foi possível registrar em *S. aversiflora*, e também a deposição polínica de i) forma direta nas partes ventrais das abelhas, por meio da vibração nas anteras de alimentação, e ii) indireta com auxílio da pétala curvada nas região dorsais, sendo esta funcionalmente uma extensão das anteras de polinização. A deposição indireta é conhecida como polinização por “*looping*” (Almeida *et al.*, 2013b) ou por “*ricochete*” (Westerkamp, 2004). Em sua maioria, o local onde ocorre a maior probabilidade de ocorrer deposição polínica corresponde ao local esperado do contato com o estigma (Armbruster *et al.*, 2014; Almeida & Castro, 2019).

Espécies de polinizadores de uma mesma planta podem apresentar diferentes capacidades de depositar e captar pólen (Armbruster *et al.*, 2005; Benitez-Vieyra *et al.*, 2006; Gervasi & Schiestl, 2017). Nossos dados demonstram que esse padrão se sustenta, assim como em outros trabalhos desenvolvidos em espécies da tribo Cassiinae (Almeida *et al.*, 2015; Amorim *et al.*, 2017; Almeida *et al.*, 2018), nos quais as abelhas de médio e grande porte atuam como polinizadores mais efetivos em comparação às abelhas menores, devido aos seus componentes aumentando a qualidade e quantidade de pólen depositados durante as visitas (Waser & Price, 1983; Herrera, 2001; Mayfield *et al.*, 2001; Almeida *et al.*, 2013b). Como consequência, diferentes abelhas podem gerar pressões de seleção diferentes (Benitez-Vieyra *et al.*, 2006; Gervasi & Schiestl, 2017).

A ocorrência de maior fluxo intermorfo do que intramorfo eleva as taxas de xenogamia e reduz as de geitonogamia (Barrett, 2002; Almeida *et al.*, 2013a). Esse fato pode ser observado

em estudos que avaliam o fluxo polínico em sistemas enantiofilicos (Westerkamp, 2004; Almeida *et al.*, 2015; 2018), corroborando com achados semelhantes obtidos no presente estudo. Dessa forma, apesar de a ampla variação morfológica encontrada na espécie, o sistema enantiofilico parece manter a dinâmica de favorecimento das taxas de xenogamia, devido aos diferentes grupos de abelhas que são polinizadoras efetivas, possibilitando mais alternativas e assim maior sucesso reprodutivo (Schaefer *et al.*, 2004; Laporta, 2005; Schiestl & Johnson, 2013; Almeida *et al.*, 2018; Morais *et al.*, 2020). Uma vez que em *Senna* temos abelhas polinizadoras com ampla variação morfológica, algumas mais efetivas que outras, espera-se que estas tenham contribuições de diferentes intensidades na mediação da seleção do fenótipo floral (Mayfield *et al.*, 2001; Jesson & Barrett, 2003). Em nosso caso, é possível que espécies de *Xylocopa* sejam a principal pressão de seleção.

A diversidade relacionada às características morfológicas entre os visitantes florais remetem a diferentes modos de interação com as flores que visitam, por sua vez, influenciando na deposição de pólen em diferentes locais e principalmente nos modos que ocorrem o contato do estigma no corpo do polinizador (Gong; Huang, 2014; Harder *et al.*, 2021). Esses modos de interação específicos resultam em uma seleção criteriosa do fenótipo floral, uma vez que esses visitantes com características específicas desempenham um papel mais eficiente na troca e transporte de pólen (Jong; Klinkhamer, 2005; Koch; Lunau; Wester, 2017). Nesse contexto, abelhas do gênero *Xylocopa*, cujas características morfológicas se ajustam mais estreitamente com as estruturas florais de *S. aversiflora*, emergem como o principal fator seletivo para o morfotipo floral (Marcelo *et al.*, 2021; Minnar; Anderson, 2021). Essa dinâmica também pode desempenhar implicações significativas no que concerne à eficácia do fluxo polínico intra e interespecífico. Assim, essas relações complexas e ainda atrelado a morfologia da heteranteria observada nas flores, permite uma variação de deposição de pólen, podendo o estigma captar em áreas da parte dorsal, como ventral do corpo da abelha. Como podemos observar na inspeção visual dos *heatmaps*, que durante as simulações ocorreram uma ampla frequência de toques na parte ventral, pólen depositado em maior parte pela anteras menores de forma direta no momento da visita do polinizador (Gong; Huang, 2014; Koch; Lunau; Wester, 2017).

### **Efeito da variação morfológica na eficiência de deposição e captação de pólen**

Os nossos resultados mostraram efeito significativo ao pc1, enquanto o pc2 está mais relacionado a profundidade, e ao que parece essa profundidade não tem um papel tão forte. Possivelmente pelo fato da morfologia e curvatura do gineceu, pois, devido a variação morfológica desta estrutura, ela pode possibilitar diferentes níveis de amplitude na captação de

pólen, independentemente de sua profundidade na flor. Da mesma forma, observamos a independência da profundidade ocorre em relação a pétala curvada, pois o pólen é ejetado e independente da profundidade, se for mantida a concavidade, ocorre o redirecionamento do pólen para o corpo do polinizador (Westerkamp, 2004; Wolowski & Freitas, 2010; Almeida *et al.*, 2013a, b). As variações na posição horizontal das estruturas reprodutivas são importantes, inclusive para a definição da enantiofilia, sendo assim esperado para sistemas de flores enantiofilas (Marazzi & Endress, 2008; Amorim *et al.*, 2017). Neste caso, em nosso estudo esse tipo de posicionamento apresentou ampla variação nos morfos, quando avaliamos o estigma. Este resultado é similar ao observado em *S. rugosa* (Braga *et al.*, 2022). Sendo assim, os diferentes morfotipos de abelhas juntamente com essas variações nas flores podem gerar maior eficiência na captação de pólen, nestas espécies. A variação morfológica floral pode estar sujeita a seleção pelos polinizadores, podendo a influência desse fator estar relacionada aos padrões de forrageamento, comportamento e tamanho dos visitantes (Nattero *et al.*, 2010; Vallejo *et al.*, 2014; Mesquita-Neto *et al.*, 2021; Naghiloo *et al.*, 2021), acarretando efeitos positivos nas taxas de sucesso reprodutivo (Harder & Barrett, 1995; Mitchell *et al.*, 2004). Assim, polinizadores diferentes podem gerar divergências drásticas e respostas adaptativas em menor escala temporal (Gervasi & Schiestl, 2017). No que concerne a sinalização floral e o tamanho do display, estes por serem preferenciais aos polinizadores, são uma ferramenta essencial das plantas, favorecendo a variação morfológica encontrada na espécie (Gervasi & Schiestl, 2017). Com isso, a variação no posicionamento dos caracteres florais pode promover contato e intensificar o ajuste corporal com os verticilos florais, permitindo que as visitas de diferentes abelhas com tamanho corporal distinto possibilitem diferentes modos de contato com o estigma e as anteras, gerando mais locais de deposição e captação (Solís-Montero; Vallejo-Marín, 2017; Armbruster *et al.*, 1989).

Dessa maneira, o movimento desempenhado pelos visitantes florais no momento da visita, além de desencadear um processo benéfico de fluxo polínico para as flores, pode também reduzir a quantidade de pólen disponível para ser retirado pelo estigma, através de um movimento de limpeza realizado por estes animais conhecido como “*grooming*”, por sua vez, é uma atividade essencial para orientação das abelhas, mas trazendo consequências significativas para a distribuição de pólen no corpo do polinizador e eficiência no fluxo polínico (Gong; Huang, 2014; Koch; Lunau; Wester, 2017). Nesse sentido, quando as abelhas vibram as flores, seus corpos ficam cobertos por grãos de pólen, sendo depositados nas estruturas pilosas de seus corpos (p. ex. cerdas, pêlos das patas, ventre e dorso; Thorp, 2000; Raine;

Chittka, 2007). Esse tipo de movimento contribui para a dispersão de pólen em diferentes partes do corpo da abelha, perdendo mais pólen em regiões que estão em contato maior com a abordagem da abelha na flor no momento da visita, como a região ventral, que pode perder pólen mais facilmente pelo *grooming* ou mesmo pelo movimento de engate a flor, diferentemente da região dorsal que apesar dos movimentos de limpeza, são áreas que conseguem manter mais grão de pólen, devido a uma redução do alcance de limpeza (as patas durante o *grooming* dificilmente acessa todo o dorso). No entanto, em flores enantiostílicas devido a assimetria de flores desse morfotipo, a captação de pólen pelo estigma pode resultar em uma variação de eficiência na captação, dependendo do morfo floral, bem como o posicionamento da abelha no momento da visita (Vallejo-Marín *et al.*, 2018; Tong; Huang, 2018).

O *grooming* realizado pelas abelhas durante a coleta de pólen pode ser um fator crítico na polinização, afetando diretamente o pólen distribuído em seus corpos e por consequência o sucesso reprodutivo das flores (Koch; Lunau; Wester, 2017; Tong; Huang, 2018). Essa interação complexa é um reflexo coevolutivo desses organismos, onde as características morfológicas das flores, a capacidade de vibração das abelhas e suas respectivas atividades de grooming evoluíram em conformidade para otimização tanto do sucesso reprodutivo dessas plantas como obtenção de recursos no momento do forrageamento (Westerkamp, 1996; Vallejo-Marín *et al.*, 2018). Assim como, o tamanho corporal desses polinizadores, que em nosso estudo mostrou que abelhas grandes como o modelo S-X além de apresentar uma maior deposição e captação de pólen, apresentam maior efetividade, sendo a espécie que desempenhou mais visitas e assim demonstrando maiores chances de ocorrer fluxo intermorfo, podendo propiciar pressão seletiva na espécie que mesmo as abelhas de tamanho médio, onde possuem probabilidade de fluxo de pólen (seja legítimo ou ilegítimo - figura 7) quase nula.

Em *S. aversiflora*, assim como em outras espécies da subtribo Cassiinae (Almeida *et al.*, 2015; 2018; Braga *et al.*, 2022) é notável uma mudança no padrão de posicionamento das suas estruturas, pela variação encontrada no arranjo floral. Em *S. aversiflora*, essas diferentes variações no posicionamento de seu gineceu e sobreposição das estruturas entre os morfos, demonstram que outros arranjos são possíveis dentro desse sistema enantiostílico. Mas ainda conservando a orientação da deflexão do gineceu em flores dos morfos direito e esquerdo (Marazzi & Endress, 2008; Amorim *et al.*, 2017; Almeida *et al.*, 2015; 2018; Almeida & Castro, 2019). Além disso, espécies da subtribo Cassiinae recebem visitas de abelhas diferentes, as quais podem estar gerando distintas pressões nas flores. Na espécie estudada este fato parece

favorecer para que se tenha uma enantiostilia muito mais complexa do que aquela já abordada em espécies de outras famílias.

### **Agradecimentos**

Agradecemos ao Instituto Chico de Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) pela autorização do estudo na Reserva Biológica de Pedra Talhada, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Pernambuco (PPGBV-UFPE) e a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela bolsa de Mestrado concedida à C.M. SILVA.

## REFERÊNCIAS

- Almeida NM 2012a.** Comportamento dos visitantes e padrões de deposição e captação de pólen para estimativa do fitness reprodutivo. - *In*: LEAL I. R., MEIADO M. V., RABBANI A. R. C. and SIQUEIRA FILHO J. A. (eds.), *Ecologia da Caatinga: Curso de campo 2011*. Gráfica Printpex, pp. 353-366.
- Almeida NM, Castro CC, Lima Leite AV, Novo RR, Machado IC 2012b.** Enantiostyly in *Chamaecrista ramosa* (Fabaceae-Caesalpinioideae): floral morphology, pollen transfer dynamics and breeding system. *Plant Biology* **15**: 369-375.
- Almeida NM, Castro CC, Lima Leite AV, Novo RR, Machado IC 2013.** Floral polymorphism in *Chamaecrista flexuosa* (Fabaceae-Caesalpinioideae): a possible case of atypical enantiostyly? *Annals of Botany* **112** (6): 1117-1123.
- Almeida NM, Cotarelli VM, Souza DP, Novo RR, Siqueira-Filho JA, Oliveira PE, Castro, CC 2015a.** Enantiostylous types of Cassiinae species (Fabaceae-Caesalpinioideae). *Plant Biology* **17** (3): 1-6.
- Almeida NM, Bezerra TT, Oliveira CRS.; Novo RR, Siqueira-Filho JÁ, Oliveira PE, Castro CC 2015b.** Breeding systems of enantiostylous Cassiinae species (Fabaceae, Caesalpinioideae). *Flora* **215**: 9-15.
- Almeida NM, Souza JT, Oliveira CRS, Bezerra TT, Novo RR, Siqueira-Filho JÁ, Oliveira PE, Castro CC 2018.** Functional dimorphic enantiostyly in monomorphic enantiostylous species of the subtribe Cassiinae (Fabaceae-Caesalpinioideae). *Plant Biology* **20** (4): 797-801.
- Almeida NM, Castro CC 2019.** Enantiostyly in Angiosperms. *In*: BAHADUR, B., *et al.*, eds. *Asymmetry in Plants: Biology of Handedness*, 319-329.
- Arceo-Gómez G, Martínez ML, Parra-Tabla V, García-Franco JG 2011.** Anther and stigma morphology in mirror-image flowers of *Chamaecrista chamaecristoides* (Fabaceae): implications for buzz pollination. *Plant Biology* **13**: 19–24.
- Amorim T, Marazzi B, Soares A, Forni-Martins ER, Muniz CR, Westerkamp C 2017.** Ricochet pollination in *Senna* (Fabaceae) - petals deflect pollen jets and promote division of labour among flower structures. *Plant Biology* **19** (6): 951-962.
- Armbruster WS, Keller S, Matsuki M, Clausen TP 1989.** Pollination of *Dalechampia magnoliifolia* (Euphorbiaceae) by male *Euglossine* bees. *American Journal of Botany* **76** (9): 1279-1285.
- Armbruster WS, Antonsen L, Pelabon C 2005.** Phenotypic selection on *Dalechampia blossoms*: Honest signaling affects pollination success. *Ecology* **86** (12): 3323-3333.
- Armbruster WS, Shi X-Q, Huang S-Q 2014.** Do specialized flowers promote reproductive isolation? Realised pollination accuracy of three sympatric *Pedicularis* species. *Annals of Botany* **113**: 331– 340.
- BFG - Brazilian Flora Group 2018.** Innovation and collaboration to meet Target 1 of the Global Strategy for Plant Conservation (GSPC). *Rodriguésia* **69** (4): 1513-1527.

- Bahadur B, Chaturvedi A, Nanna, RS 1990.** S.E.M. studies of pollen in relation to enantiostyly and heteranthy in *Cassia* (Caesalpinaceae). - *Journal of Palynology, Silver Jubilee Commemoration* **26**: 17-22.
- Barrett SCH 2002.** The evolution of plant sexual diversity. *Nature Reviews Genetics* **3**: 274–284.
- Barrett SCH, Shore JS 2008.** New Insights on Heterostyly: Comparative Biology, Ecology and Genetics. *Springer*.
- Benitez-Vieyra S, Medina AM, Glinos E, Cocucci AA 2006.** Pollinator-mediated selection on floral traits and size of floral display in *Cyclopogon elatus*, a sweat bee-pollinated orchid. *Functional Ecology* **20** (6): 948-957.
- Bates D, Maechler M, Bolker B, Walker S 2015.** Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software*, **67** (1): 1-48.
- Braga LP, Matias R, Consolaro HN, Souza JT, Almeida NM 2022.** Inaccuracy of sexual organ position and spatial variation of styles in monomorphic enantiostylous flowers of *Senna rugosa* (Fabaceae-Caesalpinioideae). *Flora* **293**.
- Brito VLG, Rech AR, Ollerton J, Sazima M 2017.** Nectar production, reproductive success and the evolution of generalised pollination within a specialised pollen-rewarding plant family: a case study using *Miconia theizans*. *Plant Systematics and Evolution* **303**: 709-718.
- Buchmann SL 1983.** Buzz pollination in Angiosperms. In: Jones CE, Little RJ. (eds.) Handbook of Experimental Pollination Biology. *Van Nostrand Reinhold*, 73-113.
- Burkart A, Lunau K, Schlindwein C 2011.** Comparative bioacoustical studies on flight and buzzing of neotropical bees. *Journal of Pollination Ecology* **6**: 118-124.
- Campbell DR, Waser NM, Price MV, Lynch EA, Mitchell RJ 1991.** Components of phenotypic selection: pollen export and flower corolla width in *Ipomopsis aggregata*. *Evolution* **45**: 1458-1467.
- Carvalho DA, Oliveira PE 2003.** Biologia reprodutiva e polinização de *Senna sylvestris* (Vell.) H.S. Irwin & Barneby (Leguminosae, Caesalpinioideae). *Revista Brasileira de Botânica* **26** (3): 319-328.
- Costa CBN, Lambert SM, Borba EL, Queiroz LP 2007.** Postzygotic reproductive isolation between sympatric taxa in the *Chamaecrista desvauxii* complex (Leguminosae-Caesalpinioideae). *Annals of Botany* **99**: 625–635.
- Dutra VF, Vieira MF, Garcia FCP, Lima HC 2009.** Fenologia reprodutiva, síndromes de polinização e dispersão em espécies de Leguminosae dos campos rupestres do Parque Estadual do Itacolomi, Minas Gerais, Brasil. *Rodriguesia* **60**: 371–387.
- Endress PK 1994.** Diversity and evolutionary biology of tropical flowers. Cambridge University Press, Cambridge.
- Gervasi DDL, Schiestl FP 2017.** Real-time divergent evolution in plants 559 driven by pollinators. *Nature Communications*, **8**: 1–8.

- Oliveira ACS, Souza JT, Brito VLG, Almeida NM 2021.** Attraction of florivores and larcenists and interaction between antagonists in *Senna rugosa* (Fabaceae). *Arthropod-Plant Interactions*, **15**: 535–544.
- Oliveira-Reboucas P, Gimenes M 2011.** Potential pollinators of *Comolia ovalifolia* DC Triana (Melastomataceae) and *Chamaecrista ramosa* (Vog.) H.S. Irwin and Barneby var. *ramosa* (Leguminosae-Caesalpinioideae), in restinga, Bahia, Brazil. *Brazilian Journal of Biology* **71** (2): 343-351.
- Gottsberger G, Silberbauer-Gottsberger I 1988.** Evolution of flower structures and pollination in Neotropical Cassiinae (Caesalpinaceae) species. *Phyton* **28**: 293-320.
- Gómez GA 2008.** Biología reproductiva de *Chamaecrista chamaecristoides* (Fabaceae), especie enantiostilica de las dunas costeras. MSc, Instituto de Ecología, A.C., Xalapa, México, pp 72.
- Gong YB, Huang SQ. 2014.** Interspecific variation in pollen–ovule ratio is negatively correlated with pollen transfer efficiency in a natural community. *Plant Biology* **16**:843–847.
- Harder LD, Barrett SCH 1995.** Mating cost of large floral displays in hermaphrodite plants. *Nature* **373**: 512– 515.
- Harder LD, Richards SA, Ågren J, Johnson SD. 2021.** Mechanisms of male-male interference during dispersal of orchid pollen. *The American Naturalist* **197**:250–265.
- Herrera CM 2001.** Deconstructing a floral phenotype: do pollinators select for corolla integration in *Lavandula latifolia*?. *Journal of Evolutionary Biology* **14**: 574-584.
- Jesson LK, Barrett SCH 2002.** Solving the puzzle of mirror-image flowers. *Nature*, **417**: 707.
- Jesson LK, Kang J, Wagner S, Barrett SCH, Dengler NG 2002.** The development of mirror image flowers. *American Journal of Botany* **90**: 181–194.
- Jong TJ, Klinkhamer PGL. 2005.** Evolutionary Ecology of Plant Reproductive Strategies. *Cambridge University Press*.
- Jesson LK, Barrett SCH 2003.** The comparative biology of mirror-image flowers. *International Journal of Sciences* **164** (5 Suppl.): 237-249.
- Kassambara A, Mundt F 2020.** Factoextra: Extract and visualize the results of Multivariate Data Analyses. R package version 1.0.7. 2020. <https://CRAN.R-project.org/package=factoextra>
- Kawai, Y.; Kudo, G 2009.** Effectiveness of buzz pollination in *Pedicularis chamissonis*: significance of multiple visits by bumblebees. *Ecological Research* **24**: 215–223.
- Koch L, Lunau K, Wester P. 2017.** To be on the safe site – Ungroomed spots on the bee’s body and their importance for pollination. *PLoS ONE* **12**:1–16.
- Kohn JR, Graham SW, Morton B, Doyle JJ, Barrett SCH 1996.** Reconstruction of the evolution of reproductive characters in Pontederiaceae using phylogenetic evidence from chloroplast DNA restriction-site variation. *Evolution*, **50**: 1454-1469.

**Laporta C 2005.** Floral biology and reproductive system of enantiostylous *Senna corymbosa* (Caesalpinaceae). *Revista de Biologia Tropical* **53**: 49-61 2005.

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

**Marazzi B, Endress PK 2008.** Patterns and development of floral asymmetry in *Senna* (Leguminosae, Cassiinae). *American Journal of Botany* **95**: 22-40.

**Marcelo VG, Brito VLG, Vallejo-Marín M, Consolaro H. 2021.** Andromonoecy in *Solanum lycocarpum* A. St. -Hil. (Solanaceae): Floral attributes, visitors and variation in sexual expression over time. *Plant Species Biology* **36**:308-321.

**Mitchell RJ, Karron JD, Holmquist KG, Bell JM 2004.** The influence of *Mimulus ringens* floral display size on pollinator visitation patterns. *Functional Ecology* **18** (1): 116-124.

**Marazzi B, Endress PK, Queiroz LP, Conti E 2006.** Phylogenetic relationships within *Senna* (Leguminosae, Cassiinae) based on three chloroplast DNA regions: patterns in the evolution of floral symmetry and extrafloral nectaries. *American Journal of Botany* **93**: 288-303.

**Marazzi B, Conti E, Endress PK 2007.** Diversity in anthers and stigmas in the buzz pollinated genus *Senna* (Leguminosae, Cassiinae). *International Journal of Plant Science* **168** (4): 371-391.

**Marazzi B, Endress PK 2008.** Patterns and development of floral asymmetry in *Senna* (Leguminosae, Cassiinae). *American Journal of Botany* **95**: 22-40.

**Melo LRF, Guimarães BMC, Barônio GJ, Oliveira LC, Cardoso RKO, Araújo TN, Telles FJ 2018.** Como as abelhas percebem as flores e por que isto é importante?. *Oecologia Australis* **22** (4): 362-389.

**Mesquita-Neto J, Vieira ALC, Schlindwein C 2021.** Minimum size threshold of visiting bees of a buzz-pollinated plant species: consequences for pollination efficiency. *American Journal of Botany* **108** (6):1006-1015.

**Minnaar C, Anderson, B. 2021.** A combination of pollen mosaics on pollinators and floral handedness facilitates the increase of outcross pollen movement. *Current Biology* **31**: 1-5.

**Morais JM, Consolaro HN, Bergamini LL, Ferrero V 2020.** Reproductive biology and pollinators in two enantiostylous *Qualea* species (Vochysiaceae) in the Brazilian Cerrado. *Plant Biology* **22**: 872-880.

**Mayfield MM, Waser N, Price M 2001.** Exploring the 'most effective pollinator principle' with complex flowers: bumblebees and *Ipomopsis aggregata*. *Annals of Botany* **88**: 591-596.

**Minnar C, Anderson B 2021.** A combination of pollen mosaics on pollinators and floral handedness facilitates the increase of outcross pollen movement. *Current Biology* **31** (14): 3180-3184.

**Mitchell RJ, Karron JD, Holmquist KG, Bell JM 2004.** The influence of *Mimulus ringens* floral display size on pollinator visitation patterns. *Functional Ecology* **18** (1) 116-124.

**Naghiloo S, Nikzat-Siahkolaee S, Esmailou Z.** Size-matching as an important driver of plant–pollinator interactions. *Plant Biology* **23** (4): 583-591.

**Nascimento EA, Del-Claro K 2007.** Floral visitors of *Chamaecrista debilis* (Vogel) Irwin & Barneby (Fabaceae - Caesalpinioideae) at Cerrado of Estação Ecológica de Jataí, São Paulo State, Brazil. *Neotropical Entomology* **36** (4): 619-624.

**Nattero J, Cocucci AA, Medel R 2010.** Pollinator - mediated selection in a specialized pollination system: matches and mismatches across populations. *Journal of Evolutionary Biology* **23**: 1957-1968.

**Oksanen J, Simpson GL, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, Minchin PR, O'hara RB, Solymos PM, Stevens HH, Szoecs E, Wagner H, Barbour M, Bedward M, Bolker B, Borcard D, Carvalho G, Chirico M, Caceres M, Durand S, Evangelista HBA, Fitzjohn R, Friendly M, Furneaux B, Hannigan G, Hill MO, Lahti L, Mcglinn, D, Ouellette ME, Cunha ER, Smith T, Stier A, Ter Braak CJF, Weedon J 2022.** Vegan: Community Ecology Package. R package version 2.6-4. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>

**Owens SJ, Lewis GP 1989.** Taxonomic and functional implications of stigma morphology in species of *Cassia*, *Chamaecrista*, and *Senna* (Leguminosae: Caesalpinioideae). *Plant Systematics and Evolution* **163**: 93-105.

**Pigozzo CM, Neves EL, Jacobi CM, Viana BF 2007.** Comportamento de forrageamento de *Xylocopa* (Neoxylocopa) *cearensis* Ducke (Hymenoptera: Apidae, Xylocopini) em uma população de *Cuphea brachiata* Koehne (Lythraceae). *Neotropical Entomology* **36** (5).

**R Core Team R 2021.** A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

**Raine NE, Chittka L. 2007.** Pollen foraging: learning a complex motor skill by bumblebees (*Bombus terrestris*). *Naturwissenschaften* **94**:459–464.

**Silva CA, Ferreira DS, Koch AK, Araújo-Silva LE 2010.** Variação na arquitetura floral e sucesso reprodutivo de duas espécies de *Helicteres* (Malvaceae), na região sudoeste de Mato Grosso. *Acta Botanica Brasilica* **24** (2) 462-468.

**Souza VC, Bortoluzzi RLC 2015.** *Senna* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB23149>>. Acesso em 10 jan de 2023.

**Souza IM, Coutinho K Funch LS 2012.** Estratégias fenológicas de *Senna cana* (Nees & Mart.) H.S. Irwin & Barneby (Fabaceae: Caesalpinioideae) como mecanismo eficiente para atração de polinizadores. *Acta Botanica Brasilica* **26** (2): 435-443.

**Solís-Montero L, Vallejo-Marín M 2017.** Does the morphological fit between flowers and pollinators affect pollen deposition? An experimental test in a buzz pollinated species with anther dimorphism. *Ecology and Evolution* **7**: 2706–2715.

**Schaefer HM, Schaefer V, Levey DJ 2004.** How plant-animal interactions signal new insights in communication. *Trends in Ecology & Evolution* **19** (11): 577– 584.

**Schiestl FP, Johnson SD 2013.** Pollinator-mediated evolution of floral signals. *Trends in Ecology & Evolution* **28** (5): 307-315.

**Studer A, Nusbaumer L, Spichiger R 2015.** Biodiversidade da Reserva Biológica de Pedra Talhada. *Genève* p. 1-818, 2015.

**Tong ZY, Huang SQ 2018.** Safe sites of pollen placement: a conflict of interest between plants and bees?. *Oecologia* 186: 163–171.

**Thorp RW. 2000.** The collection of pollen by bees. *Plant Systematics and Evolution* **222**: 211–223.

**Vallejo-Marín M, Walker C, Friston-Reilly P, Solís-Montero L, Iqic B 2014.** Recurrent modification of floral morphology in heterantherous *Solanum* reveals a parallel shift in reproductive strategy. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* **369**.

**Vallejo-Marín M, Silva EM, Sargent RD, Barrett SCH. 2010.** Trait correlates and functional significance of heteranthy in flowering plants. *New Phytologist* **188**: 418–425.

**Vallejo-Marín M, Manson JS, Thomson JD, Barrett SCH 2009.** Division of labour within flowers: heteranthy, a floral strategy to reconcile contrasting pollen fates. *Journal of Evolutionary Biology* **22**: 828–839.

**Westerkamp C. 1996.** Pollen in bee-flower relations - Some considerations on melittophily. *Acta Botanica* **109**: 325–332.

**Westerkamp C 2004.** Ricochet pollination in Cassias – and how bees explain enantiostyly. In: MAGALHÃES, F. B.; PEREIRA, J. O. eds. Solitary bees: conservation, rearing and management for pollination. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, p. 225-230.

**Wolowski M, Freitas L 2010.** Sistema reprodutivo e polinização de *Senna multijuga* (Fabaceae) em Mata Atlântica Montana. *Rodriguésia* **61** (2): 167-179.

**Wood SN.** Generalized Additive Models: An Introduction with R (2nd edition). Chapman and Hall/CRC, 2017.

## Material suplementar Capítulo 2

Tabela 5: Resultados dos modelos lineares mistos (LMMs), referentes a mensuração horizontal, vertical e profundidade das estruturas florais em relação à componente da variação em uma verificação univariada. IEI: interindividual; IM: intermorfo; IAI: intraindividual; IF: intrafloral.

Orientação	Estrutura floral	Componente da variação	Chisq	Df	p	
Horizontal	Antera de Polinização	IEI	55.011	35	0.01	*
		IM	1055.3	1	<0.00001	***
		IAI	9.7618	9	0.37	
		IF	2.9019	2	0.23	

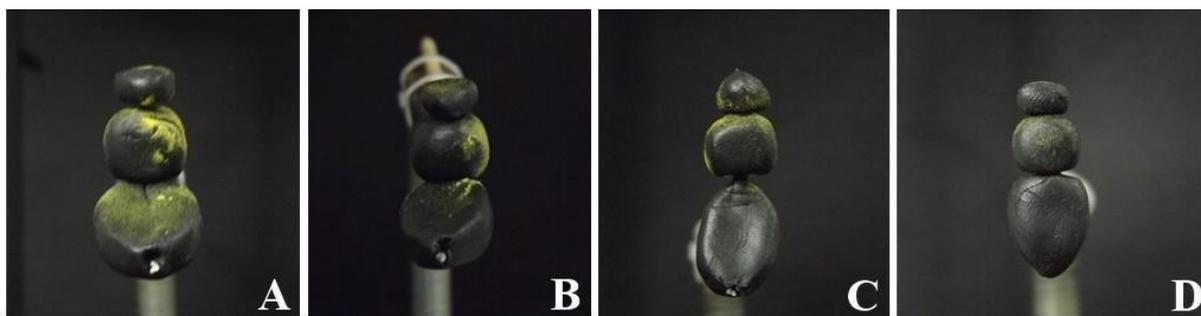
Vertical	Estigma	IEI	57.3	35	0.01	*		
		IM	14.175	1	0.0001	***		
		IAI	140.84	9	<0.00001	***		
	Pétala	IEI	71.58	35	0.0002	***		
		IM	238.21	1	<0.00001	***		
		IAI	30.003	9	0.0004	***		
	Antera de Alimentação	IEI	52.336	35	0.02	*		
			IM	101.5	1	<0.00001	***	
			IAI	4.727	9	0.85		
		IF	289.21	3	<0.00001	***		
			Antera de Polinização	IEI	78.609	35	<0.00001	***
				IM	4.8999	1	0.02	*
IAI		22.11		9	0.008	**		
IF		402.62	2	<0.00001	***			
		Estigma	IEI	71.58	35	0.0002	***	
			IM	238.21	1	<0.00001	***	
IAI			165.21	9	<0.00001	***		
Pétala		IEI	77.74	35	<0.00001	***		
	IM		0.01	1	0.92			
	IAI		0	9	1			
	Antera de Alimentação	IEI	77.153	35	<0.00001	***		
			IM	114.58	1	<0.00001	***	
			IAI	7.299	9	0.60		
		IF	2707.6	3	<0.00001	***		
			Antera de Polinização	IEI	89.91	35	<0.00001	***
				IM	18.751	1	<0.00001	***
		IAI		14.922	9	0.09	.	
		IF	400.75	2	<0.00001	***		
			Estigma	IEI	77.051	35	<0.00001	***
IM				3.8915	1	0.04	*	
IAI		15.756		9	0.07216	.		
Pétala		IEI	88.84	35	<0.00001	***		

IM	0.6293	1	0.42
IAI	0	9	<0.00001

Antera de alimentação na orientação horizontal não apresentou diferença do modelo nulo.

### Piloto das simulações

A priori, realizamos um piloto com a metodologia, para verificar a ocorrência de esgotamento do pólen ou modificação no padrão de pólen depositado (figura 1). Realizamos simulações com sonicação artificial com 100 flores. Sendo o piloto realizado com o mesmo modelo de abelha por flor (40 flores, sendo 10 por modelo de abelha), até o esgotamento floral. A segunda parte do piloto foi realizada com os quatro modelos de abelha de forma alternada, também até o esgotamento (40 flores simuladas). Este esgotamento ocorreu na nona simulação com a mesma flor, o qual nos permitiu segurança em quatro simulações por flor sem perder o padrão em similaridade na quantidade de pólen depositado. Posteriormente, realizamos simulações em 20 flores, com os modelos de abelhas, sendo quatro simulações por flor.



**Figura 1.** Simulacros demonstrando deposição de pólen em diferentes flores de morfo direito e esquerdo durante a simulação piloto: (A) primeira simulação; (B) quinta simulação; (C) sexta simulação; (D) sétima simulação.

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados encontrados nesta dissertação demonstram a importância da realização destes estudos, pois corroboram com a atualização das informações acerca das interações e processos ocorrentes em espécies enantiofilicas da subtribo Cassiinae, a partir de estratégias reprodutivas desenvolvidas por *Senna*. Em nossos achados, registramos a ocorrência de ampla variação morfológica nas flores de *Senna aversiflora*. Nossos resultados sugerem padrões de deposição e captação de pólen similares em alguns pontos dos corpos das abelhas, pela ocorrência de deposição do pólen em pontos correspondentes ao contato do estigma, podendo melhorar a precisão do fluxo polínico. No entanto, nossos dados mostram que a morfologia

floral pode afetar a eficiência de diferentes abelhas, conforme demonstrado para *Xylocopa* e *Centris*.

Dentre nossas abordagens, confirmamos a ocorrência das diferenças entre morfos, os quais apresentam reciprocidade na transferência polínica, mas demonstrando um grupo desses morfos que apresentam o posicionamento de suas características com sobreposição, porém se sustentando como grupos distintos (flores de morfo esquerdo e direito). Os resultados obtidos referentes aos visitantes florais, evidenciam que a espécie apresenta uma guilda variada de abelhas visitantes, mas só atuaram como polinizadoras as que apresentaram um limiar de tamanho mínimo e comportamento adequado. O que demonstrou uma similaridade com outros estudos com Cassiinae.

Nossos resultados sugerem que em *Senna aversiflora* o modelo estabelecido para espécies com enantiostilia apresenta algumas variações no que concerne ao posicionamento das estruturas, principalmente o gineceu, fato este também já verificado em outras espécies do gênero. Bem como, as flores apresentaram associação positiva em relação ao tamanho e disponibilidade do recurso. Mas, os visitantes mostraram preferências entre diferentes tamanhos de corola, principalmente por flores menores. Assim, nosso trabalho auxilia no preenchimento de algumas lacunas existentes em relação a correspondência de tamanho da corola em flores enantiostílicas relacionando a quantidade de recursos disponíveis.

## PERIÓDICOS

**Artigo 1: Honestidade ignorada em *Senna aversiflora* (Fabaceae): apesar da relação entre tamanho floral e recompensa de pólen, abelhas preferem flores menores**

Manuscrito a ser submetido ao periódico ANNALS OF BOTANY

Qualis: A1

Fator de Impacto: 5.040

Link de acesso às normas:

[https://academic.oup.com/aob/pages/General\\_Instructions](https://academic.oup.com/aob/pages/General_Instructions)

**Artigo 2: Interação entre variação morfológica floral e diferentes polinizadores afeta a transferência de pólen promovendo relaxamento da enantiostilia: um experimento com simulacros de abelhas**

Manuscrito a ser submetido ao periódico NEW PHYTOLOGIST

Qualis: A1

Fator de Impacto: 10.323

Link de acesso às normas:

<https://nph.onlinelibrary.wiley.com/hub/journal/14698137/about/author-guidelines>