

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E AMBIENTE

A INFLUÊNCIA DA MORFOLOGIA E DA BIOLOGIA FLORAL NO SUCESSO  
REPRODUTIVO DO ADUBO VERDE *Crotalaria juncea* L. (LEGUMINOSAE,  
PAPILIONOIDEAE)

NÍCOLAS ALBERTO POLIZELLI RICCI

ARARAS

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E AMBIENTE

A INFLUÊNCIA DA MORFOLOGIA E DA BIOLOGIA FLORAL NO SUCESSO  
REPRODUTIVO DO ADUBO VERDE *Crotalaria juncea* L. (LEGUMINOSAE,  
PAPILIONOIDEAE)

NÍCOLAS ALBERTO POLIZELLI RICCI

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Kayna Agostini

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Agricultura e Ambiente.

ARARAS

2017

Polizelli Ricci, Nicolas Alberto

A INFLUÊNCIA DA MORFOLOGIA E DA BIOLOGIA FLORAL NO  
SUCESSO REPRODUTIVO DO ADUBO VERDE *Crotalaria juncea* L.  
(LEGUMINOSAE, PAPILIONOIDEAE) / Nicolas Alberto Polizelli Ricci. --  
2017.

72 f. : 30 cm.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de São Carlos, campus  
Araras, Araras

Orientador: Kayna Agostini

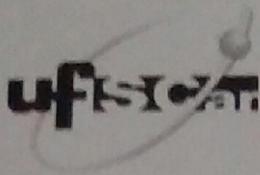
Banca examinadora: Kayna Agostini, Denise de Araújo Alves, Ricardo  
Toshio Fujihara

Bibliografia

1. *Xylocopa frontalis*. 2. Eficácia da polinização. 3. Heteranteria floral. I.  
Orientador. II. Universidade Federal de São Carlos. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo Programa de Geração Automática da Secretaria Geral de Informática (SIn).

DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Agrárias  
Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente

---

**Folha de Aprovação**

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Nicolas Alberto Polizelli Ricci, realizada em 06/02/2017:

*Kayna Agostini*

---

Profa. Dra. Kayna Agostini  
UFSCar

*Denise de Araújo Alves*

---

Profa. Dra. Denise de Araújo Alves  
USP

*Ricardo Toshio Fujihara*

---

Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujihara  
UFSCar

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por conceder saúde, discernimento e sabedoria para o desenvolvimento dessa dissertação de Mestrado.

À minha querida mãe, Silvia Maria, aos meus queridos irmãos, Leonardo José e Loraine Thalita, à minha amada avó, Vera Lúcia, às minhas tias-coruja, Sergiana Aparecida, Sarize Luzia e Soriana Ângela, aos meus cunhados, Natalia Ricci e Felipe Bueno, à minha prima, Laís Ranara e ao meu querido avô materno, Cláudio Antônio (em minha memória e coração), outro amante da Botânica, um muito obrigado, por estarem ao meu lado em todas as ocasiões, e por mostrarem que os nossos objetivos só são alcançados quando temos dedicação, paciência e persistência.

Às minhas amigas da família, sempre presentes, Melissa Luz de Oliveira e Giovana de Melo Borba, e aos amigos universitários, Bruna Machado, Juliano Schiavo, Mariana Pasetto, Matheus Siqueira, Matheus Bassetto, Paula Lopes, Luana Gabriela, Ana Carolina Volpi, Tatiane Grella, Patrícia Azevedo, Cris Pereira, Suzana Maria e Higor Pires.

À CAPES, pelo financiamento do meu projeto de pesquisa, ao longo desses dois anos.

À Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente (PPGAA), por todo o auxílio durante o Mestrado e aos técnicos do laboratório de Biologia, da UFSCar – Campus Araras/SP, Aline, João e Ângelo.

À minha querida professora e orientadora, Dr<sup>a</sup> Kayna Agostini, pela oportunidade, amizade, orientação e ajuda durante o percurso e, também, aos docentes do PPGAA e aos membros constituintes das bancas examinadoras de Qualificação e Defesa.

Aos queridos e estimados amigos do grupo de estudos em Biologia da Polinização, coordenado pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Kayna Agostini; À VI Turma de Mestrado, do Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente, da Universidade Federal de São Carlos – *Campus* Araras, pela amizade, apoio e incentivo diante dos desafios, em nossos dois anos de trajetória.

À Dona Ana, uma senhora muito gentil, que me ajudou na limpeza da área e no plantio das sementes de *Crotalaria juncea* e aos colaboradores do Viveiro Municipal de Santa Bárbara d'Oeste/SP, por cederem um espaço na estufa para o plantio de sementes de *Crotalaria juncea*, ao longo dos testes de eficácia da polinização.

“Aqui, no entanto, nós não olhamos para trás por muito tempo. Nós continuamos seguindo em frente, abrindo novas portas e fazendo coisas novas, pois somos curiosos... e a curiosidade nos conduz a novos caminhos. Siga em frente.”

**Walt Disney**

## RESUMO

O processo de polinização é um serviço ecossistêmico fundamental para o desenvolvimento de diversas espécies vegetais, incluindo o seu sucesso reprodutivo. Em *Crotalaria juncea* L., verifica-se que as flores possuem distintos morfos de anteras e comprimento dos filetes, que por sua vez podem influenciar em sua reprodução. Nesse contexto, o objetivo geral desse trabalho foi estudar o sistema de polinização e reprodutivo da espécie *C. juncea*. O objetivo do capítulo I foi verificar se a morfologia e biologia floral influenciam no comportamento dos visitantes florais. No capítulo II os objetivos foram comparar a eficácia dos visitantes florais na formação de frutos e sementes em diferentes tratamentos; e avaliar os componentes de fecundidade na espécie estudada. O estudo foi realizado em um plantio instalado em uma área verde, em Santa Bárbara d'Oeste (22°44'21.9"S; 47°21'22.6"W), no Estado de São Paulo, contendo 120 indivíduos. Os visitantes florais foram observados entre fevereiro e março de 2016. A determinação do horário de abertura floral e tempo de antese floral foram obtidos por meio de observação em campo, ao longo da floração. A receptividade estigmática foi verificada pelo teste de submersão em peróxido de hidrogênio a 3%. A estimativa de produção de pólen se deu através da contagem do número de grãos de pólen produzidos por antera. O número de grãos de pólen viáveis foi quantificado através da coloração citoplasmática, com a técnica do carmim acético. Para averiguar a eficácia dos visitantes florais na formação de frutos e sementes de *C. juncea* foram realizados testes controlados de visitas do polinizador observado, em botões florais previamente ensacados com tule. Para verificar os efeitos dos componentes de fecundidade foram contabilizados frutos desenvolvidos, em 30 indivíduos, assim como o número de sementes formadas e abortadas, em 684 frutos. Os frutos foram contados por posição (basal, mediana e apical), nas inflorescências. O mesmo método foi empregado para a formação e aborto das sementes, nos frutos. Análises de variância foram efetuadas para detecção de diferenças entre as massas dos frutos e sementes abortadas entre os testes de eficácia. Na análise dos componentes de fecundidade, foram verificadas diferenças no desenvolvimento de frutos e formação e aborto de sementes entre as posições das inflorescências e frutos, respectivamente. Através da análise da morfometria floral, verificou-se diferença entre as estruturas reprodutivas masculinas, caracterizando heteranteria floral. As observações indicaram apenas a presença das abelhas de grande porte da espécie *X. frontalis* como visitantes florais. Ao compararmos os valores obtidos entre as anteras com tecas arredondadas e as anteras com tecas alongadas, para a quantidade total de grãos de pólen, não foi obtida variação ( $p=0,5079$ ). No teste de receptividade estigmática foi visto que os estigmas estão receptivos em todas as fases da antese floral. No teste de coloração dos grãos de pólen, com carmim acético, foi constatada viabilidade polínica acima de 90%, em ambos os morfos de anteras. Houve diferença significativa no número e na massa dos frutos formados, apenas entre os tratamentos de 1 e 3 visitas de *X. frontalis*. Houve diferença significativa quando comparamos a distribuição das sementes abortadas e formadas entre as posições do fruto. Conclui-se a importância do comportamento específico das abelhas, para que consigam contatar os recursos florais, sendo que um maior número de visitas dos polinizadores pode aumentar a produtividade da cultura de *C. juncea*, resultando no aumento do número e massa dos frutos. Além disso, os recursos maternos são necessários para o desenvolvimento do fruto, porém para a semente é mais vantajoso estar próximo ao estigma.

**Palavras-chave:** abelhas, cultura agrícola, eficácia, heteranteria floral, recursos florais.

## ABSTRACT

The pollination is a fundamental ecosystem function for the plants development, including the reproductive success. In *Crotalaria juncea* L., it is verified that the flowers have distinct anthers morphs and fillets length, which in turn can influence in their reproduction. In this context, the aim of this manuscript was to study the pollination and reproductive system of *C. juncea*. The aim of the chapter I were to verify if floral morphology and biology influence the behavior of floral visitors. The aim of the chapter II were to compare the efficacy of floral visitors in the fruits and seeds set in different treatments; and to evaluate the fertility components. The study was carried out in a planting area in a green area, in Santa Bárbara d'Oeste (22°44'21.9"S; 47°21'22.6"W), São Paulo, with 120 individuals. Floral visitors were observed between February and March 2016. Determination of floral opening and floral anthesis were obtained through field observation, during flowering. The stigmatic receptivity was verified by the 3% hydrogen peroxide submersion test. The estimate of pollen production was given by counting the number of pollen grains produced by anther. The number of viable pollen grains was quantified through cytoplasmic staining, using the acetic carmine technique. To verify the effectiveness of flowering visitors in the formation of fruits and seeds of *C. juncea*, controlled tests of pollinator visits were carried out on floral buds previously bagged with tulle. In order to verify the effects of the fertility components, developed fruits were counted in 30 individuals, as well as the number of developed and aborted seeds in 684 fruits. The fruits were counted by position (basal, median and apical), in the inflorescences. The same method was used for the development and abortion of the seeds in the fruits. Variance analyzes were performed to detect differences between developed and aborted seeds masses in efficacy tests. In the analysis of the fecundity components, differences in fruit development and seed abortion were observed between the inflorescence and fruit positions, respectively. Through analysis of floral morphometry, there was a difference between male reproductive structures, characterizing floral heteranthy. The observations indicated only the presence of large bees (*X. frontalis*) as floral visitors. When comparing the values obtained between the small anthers and the large anthers, for the total amount of pollen grains, no variation was obtained ( $p=0,5079$ ). In the stigmatic receptivity test it was seen that the stigmas are receptive in all phases of floral anthesis. In the test of staining of the pollen grains, with acetic carmine, pollen viability was verified above 90%, in both morphs of anthers. There was a significant difference in the number and mass of the fruits developed, only between treatments of 1 and 3 visits of *X. frontalis*. There was a significant difference when comparing the distribution of the aborted and developed seeds between the fruit positions. It is concluded that the specific behavior of the bees is important in order to be able to contact the floral resources, and a greater number of visits of the pollinators can increase the productivity of the *C. juncea* crop, resulting in an increase in the number and mass of the fruits. In addition, maternal resources are necessary for the development of the fruit, but for the seed it is more advantageous to be near to the stigma.

**Key-words:** bees, agriculture crop, efficacy, floral heteranthy, floral resources.

## SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS .....	8
LISTA DE FIGURAS .....	9
INTRODUÇÃO GERAL .....	11
<b>CAPÍTULO I. Morfologia e biologia floral de <i>Crotalaria juncea</i> L. (Leguminosae, Papilionoideae): relacionamento da quilha com o polinizador específico .....</b>	<b>15</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>15</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>16</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>20</b>
<b>2.1 A espécie <i>Crotalaria juncea</i> L.....</b>	<b>20</b>
<b>2.2 Local de estudo .....</b>	<b>21</b>
<b>2.3 Biologia floral de <i>Crotalaria juncea</i> .....</b>	<b>22</b>
<b>2.3.1 Antese.....</b>	<b>22</b>
<b>2.3.2 Caracterização das estruturas reprodutivas e da quilha de <i>Crotalaria juncea</i> .....</b>	<b>23</b>
<b>2.3.3 Receptividade estigmática .....</b>	<b>23</b>
<b>2.3.4 Contagem de grãos de pólen em diferentes morfos de anteras .....</b>	<b>23</b>
<b>2.3.5 Viabilidade polínica.....</b>	<b>24</b>
<b>2.4 Frequência e comportamento dos visitantes florais de <i>Crotalaria juncea</i> .....</b>	<b>25</b>
<b>3. RESULTADOS .....</b>	<b>25</b>
<b>3.1 Características morfológicas, florais e dos frutos de <i>Crotalaria juncea</i> .....</b>	<b>25</b>
<b>3.2 Biologia floral de <i>Crotalaria juncea</i> .....</b>	<b>27</b>
<b>3.2.1 Antese.....</b>	<b>27</b>
<b>3.2.2 Caracterização das estruturas reprodutivas e da quilha de <i>Crotalaria juncea</i> .....</b>	<b>29</b>
<b>3.2.3 Receptividade estigmática .....</b>	<b>31</b>
<b>3.2.4 Contagem de grãos de pólen em diferentes morfos de anteras.....</b>	<b>32</b>
<b>3.2.5 Viabilidade polínica.....</b>	<b>34</b>
<b>3.3 Frequência e comportamento dos visitantes florais de <i>Crotalaria juncea</i> .....</b>	<b>34</b>
<b>4. DISCUSSÃO .....</b>	<b>36</b>
<b>4.1 Biologia floral de <i>Crotalaria juncea</i> .....</b>	<b>36</b>

4.1.1 Antese.....	36
4.1.2 Caracterização das estruturas reprodutivas e da quilha de <i>Crotalaria juncea</i> .....	37
4.1.3 Receptividade estigmática.....	38
4.1.4 Contagem de grãos de pólen em diferentes morfos de anteras.....	39
4.1.5 Viabilidade polínica.....	40
4.2 Frequência e comportamento dos visitantes florais de <i>Crotalaria juncea</i> .....	41
5. CONCLUSÃO.....	43
CAPÍTULO II. Eficácia de <i>Xylocopa frontalis</i> (Olivier, 1789) e efeitos dos componentes de fecundidade em flores de <i>Crotalaria juncea</i> L. (Leguminosae, Papilionoideae).....	44
RESUMO .....	44
ABSTRACT .....	45
1. INTRODUÇÃO.....	46
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	48
2.1 A espécie <i>Crotalaria juncea</i> L.....	48
2.2 Local de estudo .....	48
2.3 Eficácia de visitas de <i>Xylocopa frontalis</i> em flores de <i>Crotalaria juncea</i> .....	49
2.4 Efeitos dos componentes de fecundidade em flores de <i>Crotalaria juncea</i> .....	51
3. RESULTADOS .....	52
3.1 Eficácia de visitas de <i>Xylocopa frontalis</i> em flores de <i>Crotalaria juncea</i> .....	52
3.2 Efeitos dos componentes de fecundidade em flores de <i>Crotalaria juncea</i> .....	55
4. DISCUSSÃO .....	57
4.1 Eficácia de visitas de <i>Xylocopa frontalis</i> em flores de <i>Crotalaria juncea</i> .....	57
4.2 Efeitos dos componentes de fecundidade em flores de <i>Crotalaria juncea</i> .....	58
5. CONCLUSÃO.....	59
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	60
REFERÊNCIAS.....	62

## LISTA DE QUADROS

### **CAPÍTULO I. Morfologia e biologia floral de *Crotalaria juncea* L. (Leguminosae, Papilionoideae): relacionamento da quilha com o polinizador específico**

**Quadro 1.** N° total de grãos de pólen e média  $\pm$  desvio padrão, em diferentes morfos de anteras, em *C. juncea* (10 anteras para cada um dos morfos) ..... 32

### **CAPÍTULO II. Eficácia de *Xylocopa frontalis* (Olivier, 1789) e efeitos dos componentes de fecundidade em flores de *Crotalaria juncea* L. (Leguminosae, Papilionoideae)**

**Quadro 1.** Número de frutos formados, nos três tratamentos de visitas de *X. frontalis* às flores de *C. juncea*, assim como os valores do teste G e valores de *p*, utilizados na comparação dos diferentes tratamentos ..... 53

**Quadro 2.** Massa média ( $\pm$  desvio-padrão) dos frutos formados, nos três tratamentos de visitas de *X. frontalis* às flores de *C. juncea*, assim como os valores de *p*, por meio do teste de Kruskal-Wallis (H) e índice de Dunnett ..... 54

**Quadro 3.** Número de sementes desenvolvidas, nos três tratamentos de visitas de *X. frontalis* às flores de *C. juncea*, assim como os valores de *p*, por meio do teste de Kruskal-Wallis e índice de Dunnett ..... 54

**Quadro 4.** Número total de abortos das sementes de *C. juncea*, nos testes de eficácia de *X. frontalis*, de acordo com a posição no fruto (basal, mediana e apical) ..... 54

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I. Morfologia e biologia floral de *Crotalaria juncea* L. (Leguminosae, Papilionoideae): relacionamento da quilha com o polinizador específico

- Figura 1.** Flor de *C. juncea*, mostrando as diferentes pétalas que compõem a corola (estandarte, ala e quilha). A corola possui coloração amarela, antese diurna e é pentâmera (corola composta por cinco pétalas). As flores estão dispostas em inflorescências que contêm de quatro a 20 botões florais e apresentam abertura floral do tipo acrópeta.....20
- Figura 2.** Área verde, no município de Santa Bárbara d'Oeste - SP, no qual foi realizado o plantio de *C. juncea* e o plantio de quiabo, situado próximo ao local estudo, indicados pelas setas (a Figura 2 mostra o local de estudo 30 dias após o plantio de *C. juncea* – data: 01/01/2016)..... 21
- Figura 3.** Estágios de desenvolvimento floral de *C. juncea*: (1) botão floral, (2) 24h da antese floral, (3) 48h da antese floral, (4) 72h da antese floral, (5) 96h e início da senescência floral - estandarte, alas e quilha começam a murchar, (6) 120h e senescência floral completa – estandarte, alas e quilha estão completamente murchos e a coloração muda de amarelo para alaranjado..... 22
- Figura 4.** Grãos de pólen no teste de coloração carmin acético: (A) grão de pólen viável (V) e não viável (NV) do filete com morfo das tecas das anteras arredondado, e (B) grão de pólen viável (V) e não viável (NV) do filete com morfo das tecas das anteras alongado. Aumento do microscópio de luz = 400x ..... 25
- Figura 5.** A. Peças florais de *C. juncea* (estandarte – pétala maior, alas – pétalas laterais da corola e quilha – duas pétalas fundidas que abrigam e protegem as estruturas reprodutivas – dez anteras e um estigma). B. Filetes com tecas das anteras arredondadas (numeração em preto) e alongadas (numeração em vermelho). Deiscência longitudinal das anteras indicada com a seta azul. C. Ápice do estilete recoberto por tricomas. D. Inflorescência com os frutos (vagens) formados. E. Corte longitudinal do ovário – as numerações em preto indicam os óvulos, que apresentam distribuição linear e estão organizados em duas fileiras ..... 27
- Figura 6.** Abertura sequencial dos botões florais (acrópeta), na inflorescência de *C. juncea*. Note que as flores situadas na posição basal da inflorescência estão abertas, enquanto os botões florais situados nas posições mediana e apical encontram-se fechados..... 28
- Figura 7.** (A) Antera alongada de *C. juncea*, evidenciando as tecas e a deiscência longitudinal do morfo (comprimento = 2mm, aumento = 400x) (B) Antera arredondada, mostrando as tecas e a deiscência longitudinal do morfo (comprimento = 300µm, aumento = 3000x) (C) Estilete, evidenciando a grande quantidade de tricomas em sua superfície (comprimento = 2mm, aumento = 300x) (D) Superfície estigmática, coberta por grande quantidade de tricomas. Note que o estigma possui um formato de gancho, que pode estar ligado ao movimento de bombeamento dos grãos de pólen pelo ápice da quilha (comprimento = 500µm, aumento = 1200x) (E) Quilha da flor, coberta por grande quantidade de tricomas (comprimento = 2mm, aumento = 500x) (F) Os tricomas da quilha unem-se pelas extremidades, permitindo a abertura da quilha e exposição das estruturas reprodutivas, durante o forrageio da *X. frontalis* (comprimento = 50µm, aumento = 1500x) .....30
- Figura 8.** Teste de receptividade dos estigmas de *C. juncea*: nos estágios 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D) e 5 (E). As setas correspondem às bolhas formadas durante a submersão do estilete, em peróxido de hidrogênio a 3% ..... 31
- Figura 9.** Flor de *C. juncea* evidenciando os diferentes estágios de desenvolvimento do androceu – (A) estágio 1: botão floral com a deiscência longitudinal: filetes das anteras com tecas arredondadas estão num comprimento menor em relação ao comprimento dos filetes das anteras com tecas alongadas, e as tecas das anteras ainda não estão liberando os grãos de pólen (B) estágio 2: filetes das anteras com tecas arredondadas igualam-se ao comprimento dos filetes das anteras com tecas alongadas e a fenda longitudinal entre as tecas inicia a liberação

dos grãos de pólen (C) estágio 3: filetes das anteras com tecas arredondadas ainda possuem o mesmo comprimento dos filetes das anteras com tecas alongadas (D) estágio 4: filetes das anteras com tecas arredondadas ultrapassam o comprimento dos filetes das anteras com tecas alongadas. Aumento do microscópio de luz = 45x ..... 33

**Figura 10.** Viabilidade média (%) dos grãos de pólen de *C. juncea*, nos diferentes estágios florais (2, 3 e 4), em diferentes morfos de anteras (anteras com tecas arredondadas e anteras com tecas alongadas)..... 34

**Figura 11.** Vista lateral de um indivíduo de *X. frontalis*, ao pousar na flor para coletar néctar. Note os pares de pernas anteriores e medianas agarrando as alas da corola de *C. juncea*, indicado na seta..... 35

**Figura 12.** Número de visitas de *X. frontalis* em *C. juncea*, por período do dia, nos estágios florais 2, 3 e 4 (n=10 flores por estágio) ..... 36

## CAPÍTULO II. Eficácia de *Xylocopa frontalis* (Olivier, 1789) e efeitos dos componentes de fecundidade em flores de *Crotalaria juncea* L. (Leguminosae, Papilionoideae)

**Figura 1.** Inflorescência de *C. juncea* ensacada com tule para realização dos testes de eficácia do polinizador com relação ao número de visitas: (A) botões florais, (B) flores abertas e (C) fruto maduro ..... 50

**Figura 2.** Corte longitudinal do fruto de *C. juncea*, com os indicativos das posições da vagem (basal, mediana e apical) e a formação e aborto das sementes ..... 50

**Figura 3.** Fêmeas de *X. frontalis* forrageando as flores de *C. juncea*. As *X. frontalis* visitam as flores de *C. juncea*, em busca de néctar, e, ao pousarem na quilha, acionam o mecanismo de liberação dos grãos de pólen, que se aderem em sua região torácica e abdominal ventral e pernas anteriores e medianas..... 52

**Figura 4.** Box-plot do número de frutos formados, de acordo com a posição nas inflorescências de *C. juncea* (basal, mediana e apical). A mediana representa a linha horizontal dentro da caixa. Valores máximo e mínimo são representados por linhas horizontais curtas, círculos representam valores fora do limite interno da caixa. Médias com letras iguais não diferem estatisticamente entre si a  $p < 0,05$  ..... 56

**Figura 5.** Box-plot do número de sementes formadas, de acordo com a posição nos frutos de *C. juncea* (basal, mediana e apical). A mediana representa a linha horizontal dentro da caixa. Valores máximo e mínimo são representados por linhas horizontais curtas, círculos representam valores fora do limite interno da caixa. Médias com letras diferentes diferem estatisticamente entre si a  $p < 0,05$ ..... 56

**Figura 6.** Box-plot do número de sementes abortadas, de acordo com a posição nos frutos de *C. juncea* (basal, mediana e apical). A mediana representa a linha horizontal dentro da caixa. Valores máximo e mínimo são representados por linhas horizontais curtas, círculos representam valores fora do limite interno da caixa. Médias com letras diferentes diferem estatisticamente entre si a  $p < 0,05$ ..... 57

## INTRODUÇÃO GERAL

A polinização consiste na transferência de grãos de pólen contido nas anteras para a superfície estigmática, para que o processo de fertilização e reprodução sexuada ocorra e conseqüentemente haja o desenvolvimento de frutos e sementes (Willmer, 2011; Oliveira; Maruyama, 2014). É um processo importante para a reprodução das plantas com flores, para a produção de alimentos e para a manutenção da rede de interações entre animais e plantas, assim constituindo um serviço ecossistêmico básico (Waser; Ollerton, 2006; Yamamoto et al., 2010). Os estudos em biologia da polinização envolvem todos os fatores que ocorrem no processo de reprodução da planta, desde a antese floral até a formação de frutos e sementes (Faegri; van der Pijl, 1980).

As diferentes características de um determinado sistema de polinização não são necessariamente exclusivas, mas podem aparecer em mais de um sistema de polinização (Vogel, 1954; Faegri; van der Pijl, 1979; Rech; Bergamo; Figueiredo, 2014). Assim, a combinação de atributos florais como coloração, morfologia, antese, recursos e anatomia floral, sugere a associação da planta com determinado sistema de polinização, que pode ser biótico ou abiótico (Vogel, 1954; van der Pijl, 1960; 1961).

Os atributos florais foram demonstrados por van der Pijl (1961), como um conjunto de adaptações convergentes das flores ao mecanismo sensorial dos polinizadores bióticos, ou ao meio abiótico responsável pela polinização (água, vento) e, pode-se ressaltar que há espécies vegetais que podem ter um sistema de ambofilia, isto é, as suas flores podem ser polinizadas por vetores bióticos e abióticos simultaneamente, podendo considerar resistência e estabilidade à ambofilia, na medida em que dependem de dois vetores de dispersão polínica distintos (Culley et al., 2002).

As características florais podem restringir ou orientar a acessibilidade do visitante aos recursos e determinar o grau de dependência nas relações planta-polinizador (Sakai et al., 1998). Portanto, a riqueza de polinizadores em determinadas espécies vegetais está intimamente relacionada às suas características florais, que são capazes de atrair, repelir e até mesmo mobilizar o desenvolvimento de um processo de aprendizagem na manipulação de estruturas que possuem acesso restrito para a maioria das espécies. Assim, muitas espécies vegetais desenvolveram características florais, que permitiram a restrição do acesso ao pólen e o controle da taxa de remoção, processo resultante de uma provável competição entre plantas e visitantes florais (De Luca; Vallejo-Marín, 2013). Sobre isso, estudos podem ser realizados por meio do acesso controlado das espécies polinizadoras às flores, podendo variar o número de visitas das mesmas, com o objetivo de comparar a efetividade do visitante floral na

formação de frutos e sementes, fornecendo dessa maneira, dados relevantes para a identificação de polinizadores-chave (Klein et al., 2007).

Há culturas que possuem a capacidade de se autofecundarem, ou seja, não são dependentes dos polinizadores para se reproduzirem, como é o caso do tomate (Hayashi-Trevizor, 2014), da berinjela (Zambon, 2015), da soja (Juliano, 1976; Moreti et al., 1993; Nogueira-Couto, 1994; Ribeiro; Nogueira-Couto, 2002) e do café (Klein; Steffan-Dewenter; Tschardtke, 2003). Entretanto, se as mesmas forem polinizadas por vetores bióticos, a qualidade do fruto (massa e número de sementes), bem como o número de frutos produzidos, podem ter um acréscimo significativo, aumentando consequentemente a produtividade agrícola (Kevan; Phillips, 2001). Um estudo encontrou maior produção de sementes viáveis de soja resultantes de flores visitadas pelas abelhas (66,17%) do que aquelas não visitadas por abelhas (33,83%) para o cultivar Conquista (Ribeiro; Nogueira-Couto, 2002). Na cultura do café, o estudo de Klein; Steffan-Dewenter e Tschardtke (2003) mostrou que a espécie é autocompatível, mas o aumento na produção de frutos deve-se à relação com a polinização por abelhas. Comparando 24 sistemas agroflorestais da Indonésia, a frutificação do café pode ser favorecida com o acréscimo do número de espécies das abelhas que visitam as flores da cultura, passando de 60% de frutificação (três espécies) a 90% (20 espécies). Isso sugere que diferenças mínimas na quantidade e na eficácia dos polinizadores podem acarretar variações significativas nos índices de produtividade agrícola (Freitas; Nunes-Silva, 2012).

Entretanto, algumas culturas possuem total dependência da polinização biótica para formação de frutos e sementes, sendo que sem os visitantes florais haveria uma redução de 90% no sucesso reprodutivo. Dentre essas culturas podem ser destacadas a atemoya, coco, kiwi, maracujá, macadâmia, avelã, abóbora, melancia, melão, acerola, baunilha e banana indiana (Klein et al., 2007). Dessa forma, uma das primeiras medidas para promover a conservação de polinizadores é motivar estudos sobre as relações existentes entre polinizadores e plantas economicamente importantes, o que engloba a análise do papel ecológico e econômico dos polinizadores e informações essenciais, como o efeito da polinização na produção de frutos e sementes (Allen-Wardell; Bernhardt; Bitner, 1998).

O sucesso reprodutivo dos vegetais é determinado por dois estágios: o pré-emergente e o pós-emergente. O primeiro se refere ao número de óvulos que se desenvolverão em sementes viáveis, enquanto o segundo está relacionado à germinação da semente e ao desenvolvimento da planta, incluindo sua fase reprodutiva (Wiens et al., 1987). Desta forma, estudos dos componentes de fecundidade possibilitam verificar a existência de problemas reprodutivos, inclusive os relacionados com a nutrição do embrião pelos recursos maternos e

identificar problemas no estágio pré-emergente que possam influenciar no sucesso reprodutivo da planta.

Em várias famílias de Angiospermae, sementes viáveis são formadas a partir de pequena proporção de óvulos; os demais óvulos não se desenvolvem pela ausência de fertilização ou, se são fertilizados, os embriões são abortados durante o desenvolvimento (Sedgley, 1980; Bawa; Webb, 1984; Queller, 1985). Pouco se conhece sobre as causas e implicações da mortalidade entre a fertilização e a maturidade da semente (Lloyd, 1980; Stephenson, 1981; Udovic; Aker, 1981). Para explicar a ocorrência de abortos em plantas, existem várias hipóteses, como a de seleção sexual, atribuindo os abortos à otimização do sucesso reprodutivo masculino e feminino (Lloyd, 1980), a que envolve a paternidade do zigoto (Janzen, 1977), a combinação de genes letais (Martin; Lee, 1993), a quantidade de grãos de pólen depositados no estigma (Mogensen, 1975) e a competição dos óvulos por recursos necessários para o desenvolvimento das sementes (Lloyd, 1980). Em Angiospermae, a quantidade de frutos viáveis geralmente é menor que o número de flores produzidas pelo indivíduo. Possíveis explicações para o observado podem estar relacionadas ao processo de fertilização e ao aborto durante a embriogênese (Sedgley, 1980; Bawa; Webb, 1984).

Leguminosae Juss., é a segunda maior família de eudicotiledôneas, compreendendo cerca de 751 gêneros e aproximadamente 19.500 espécies (LPWG, 2013), que ocorrem nas regiões tropicais e temperadas. É tradicionalmente composta por três subfamílias: Caesalpinioideae, que inclui quatro tribos, 171 gêneros e 2.250 espécies; Mimosoideae, constituída de quatro tribos e aproximadamente 83 gêneros e 3.270 espécies, e, Papilionoideae, a maior das três subfamílias, que compreende 28 tribos, 478 gêneros e 13.800 espécies (Lewis et al., 2005; LPWG, 2013).

Leguminosae possui distribuição cosmopolita, além de ser a segunda família botânica em importância econômica, sendo superada apenas por Poaceae (Judd et al., 1999). Muitas espécies de Leguminosae (e.g *Canavalia ensiformis* (L.) D.C., *Crotalaria juncea* L. e *Mucuna pruriens* (L.) D.C.) são utilizadas na adubação verde, pois trazem muitas vantagens tanto para o solo, quanto para as plantas. Dentre esses benefícios são destacados o controle de erosão, potencial para cobertura do solo evitando seu aquecimento, equilíbrio ecológico, conservação da umidade do solo, fixação biológica do nitrogênio atmosférico, ciclagem de nutrientes das camadas mais profundas do solo para regiões onde as plantas cultivadas conseguem retirá-los (Fávero et al., 2000; Faria et al., 2004; Formentini et al., 2008). Entender a biologia da polinização e reprodutiva dessas espécies de Leguminosae, que são utilizadas como adubo

verde, é de fundamental importância, pois a sua propagação acontece através de sementes, necessitando da intervenção de polinizadores (Mazzuco, 2008).

Outro ponto deve-se principalmente ao produtor, que adota a rotação de culturas, realizar o plantio de alguns indivíduos do adubo verde ao redor das culturas e não realizar o corte antes da floração. Esses indivíduos na área periférica da cultura seriam importantes para a formação de frutos e a produção de sementes, além de manter os polinizadores na área agrícola, pois a polinização de plantas cultivadas depende do manejo da cultura e da qualidade dos habitats adjacentes (Klein; Steffan-Dewenter; Tschardtke, 2003).

A partir desse contexto, o objetivo geral desse trabalho foi estudar o sistema de polinização e reprodutivo da espécie *Crotalaria juncea*. Este trabalho foi dividido em dois capítulos. O objetivo do primeiro capítulo foi verificar se a morfologia e biologia floral influenciam no comportamento dos visitantes florais. No segundo capítulo, os objetivos foram comparar a eficácia dos visitantes florais na formação de frutos e sementes de *C. juncea*, em diferentes tratamentos, e avaliar os efeitos dos componentes de fecundidade, na espécie estudada.

Ao capítulo I era esperado que as espécies da subfamília Papilionoideae, incluindo a espécie *Crotalaria juncea*, apresentassem características florais que permitissem o forrageio por insetos, como o perfume adocicado, antese diurna, cores vistosas e oferta de diferentes recursos florais (Endress, 1994), sendo esses atributos relacionados ao sistema de polinização por abelhas (Faegri; van der Pijl, 1979).

Ao capítulo II era esperado que quanto maior o número de visitas em flores de *C. juncea*, maior seria a quantidade de grãos de pólen transportados ao estigma, portanto maior número de tubos polínicos, resultando na fecundação das oosferas e proporcionando maior número e massa dos frutos. Com relação aos componentes de fecundidade de *C. juncea* foi sugerido que as posições basais das inflorescências apresentassem maior formação de frutos, pois se pode potencializar o uso de recursos da planta-mãe para a formação de progênies aptas (Lloyd, 1980), portanto maior probabilidade de desenvolvimento de frutos em posições próximas ao acesso aos recursos. Quanto ao aborto das sementes, deveria ocorrer em maior quantidade nas posições do ovário mais distantes do estigma, pois esta é a situação mais comum para Leguminosae (Bawa; Buckley, 1989). Neste caso, óvulos basais seriam fertilizados pelos tubos polínicos com crescimento mais lento ou com menor capacidade competitiva e, portanto, mais propensos a serem abortados (Martin; Lee, 1993; Gibbs; Sasaki, 1998).

**CAPÍTULO I. MORFOLOGIA E BIOLOGIA FLORAL DE *Crotalaria juncea* L.  
(LEGUMINOSAE, PAPILIONOIDEAE): RELACIONAMENTO DA QUILHA COM  
O POLINIZADOR ESPECÍFICO**

**RESUMO**

Um dos mecanismos mais peculiares de algumas espécies de plantas é possuir estruturas que limitem o acesso dos visitantes aos recursos florais, incluindo o pólen e o néctar. Um aspecto na forma das flores que restringe o acesso aos visitantes florais pode ser encontrado nas flores com quilha (*keel blossoms*). O objetivo desse capítulo é verificar se a morfologia e biologia floral influenciam no comportamento do polinizador específico de *Crotalaria juncea* L.. O estudo foi realizado em um plantio de *C. juncea*, situado numa área verde do município de Santa Bárbara d'Oeste (22°44'21.9"S;47°21'22.6"W). Instalaram-se 120 plantas, em dezembro de 2015. A floração da espécie ocorreu na primeira semana de fevereiro de 2016. Testes foram realizados para ampliar o conhecimento da espécie estudada: (1) antese floral, (2) receptividade estigmática, (3) contagem de grãos de pólen em diferentes morfos de anteras, (4) teste de viabilidade polínica e (5) frequência e comportamento dos visitantes florais. (1) A abertura dos botões florais de *C. juncea* inicia às 10:00h e permanece até às 18:00h, durante três dias consecutivos. A antese floral dura seis dias e os botões florais possuem abertura do tipo acrópeta (da base ao ápice da inflorescência). (2) Os estigmas estão receptivos do estágio 1 ao 5 – início da senescência floral. (3) As flores de *C. juncea* possuem estames dimórficos (heteranteria), sendo cinco estames longos e cinco curtos. Nos valores obtidos entre as anteras com tecas arredondadas e as anteras com tecas alongadas foi obtida variação no número de grãos de pólen nos diferentes morfos ( $p < 0,001$ ). (4) Nas anteras com tecas arredondadas, as médias de viabilidade dos grãos de pólen dos estágios florais 2, 3 e 4 foram 97,4%, 97,3% e 95,4%, respectivamente. Para as anteras com tecas alongadas, as médias de viabilidade dos grãos de pólen dos estágios florais 2, 3 e 4 foram 97,5%, 96,6% e 93,7%, respectivamente. Não foi observada diferença significativa na viabilidade dos grãos de pólen entre os estágios florais analisados, nas anteras com tecas arredondadas ( $F_{[2,27]}=2,884$ ,  $p=0,073$ ), porém, houve diferença significativa, nas anteras alongadas ( $F_{[2,27]}=9,258$ ,  $p < 0,001$ ). Essa variação deveu-se à diferença entre os estágios 2 e 4 ( $p=0,010$ ) e entre os estágios 3 e 4 ( $p < 0,001$ ). (5) Ao longo das 140 horas de observação em campo, apenas fêmeas de *Xylocopa frontalis* (Olivier, 1789), espécie de abelha de grande porte, visitaram as flores de *C. juncea*. Observa-se que a disposição das peças florais de *C. juncea* e o dimorfismo do androceu influenciaram no sistema de polinização por abelhas, pois *X. frontalis* foi a única espécie que forrageou nas flores estudadas. O comportamento de pouso de *X. frontalis* no complexo alas-quilha possibilitou a exposição do estilete e a deposição dos grãos de pólen aderidos nas pernas e região ventral, sendo considerado um agente polinizador eficaz para *C. juncea*.

**Palavras-chave:** estruturas reprodutivas florais, flores com quilha, antese floral, mamangavas, polinização.

**CHAPTER I. FLORAL MORPHOLOGY AND BIOLOGY IN *Crotalaria juncea* L.  
(LEGUMINOSAE, PAPILIONOIDEAE): RELATIONSHIP OF THE KEEL WITH  
THE SPECIALIZED POLLINATOR**

**ABSTRACT**

One of the most peculiar mechanisms of plants is to have structures that limit the access of floral visitors to the resources, including pollen and nectar. An aspect in the form of flowers that functions restricting access to floral visitors can be found in *keel blossoms*. The aim of this chapter is to verify if the floral biology and morphology influence the behavior of the specialized pollinator in *Crotalaria juncea* L.. The study was carried out in a plantation of *C. juncea*, located in a green area of the municipality of Santa Bárbara d'Oeste (22°44'21.9"S; 47°21'22.6"W). 120 plants were planted in December 2015. Flowering of the species occurred in the first week of February 2016. Some tests were carried out to better understand the species studied, among them: (1) floral anthesis, (2) stigmatic receptivity, (3) count of pollen grains in different anther morphs, (4) pollen viability and (5) frequency and behavior of floral visitors. (1) The opening of the floral buds of *C. juncea* beginning at 10a.m. and remains until 6p.m. on three consecutive days. The floral anthesis lasts six days and the floral buds have acropetal opening (from the base to the top of the inflorescence). (2) Stigmas of *C. juncea* are receptive in the stage 1 to 5 - beginning of floral senescence. (3) *C. juncea* flowers they have dimorphic stamens, containing five long stamens and five short stamens. When comparing the values obtained between the small anthers and the large anthers, the number of pollen grains between morphs were different ( $p < 0,001$ ). (4) In the small anthers, the following averages were obtained to the 2, 3 and 4 floral stages: 97,4%, 97,3% and 95,4%, respectively. In the large anthers, the following averages were obtained to the 2, 3 and 4 floral stages: 97,5%, 96,6% and 93,7%, respectively. However, there was not a significant difference in the small anthers ( $F_{[2,27]}=2,884$ ,  $p=0,073$ ), but there was a significant difference in the large anthers ( $F_{[2,27]}=9,258$ ,  $p < 0,001$ ). This difference were between 2 and 4 stages ( $p=0,010$ ) and 3 and 4 stages ( $p < 0,001$ ). (5) During the 140 hours of observation, only visits of large bees, females, of *Xylocopa frontalis* (Olivier, 1789) were observed. It is observed that the floral arrangement of *C. juncea* and the androceu dimorphism influenced the pollination system by bees, because *X. frontalis* was the only species that foraged the flowers. The landing behavior of *X. frontalis* in the wings-keel complex allowed the exposure of the stylet and the deposition of the pollen grains on the legs and ventral region, being considered an effective pollinator to the *C. juncea*.

**Key-words:** floral reproductive structures, keel blossoms, floral anthesis, bumble bee, pollination.

## 1. INTRODUÇÃO

A diversidade floral é atribuída ao processo evolutivo de cada espécie de angiosperma, que permitiu a atração visual de animais polinizadores à flor, principalmente à corola, caracterizada por exibir diferentes cores, formas e atração (Fahn, 1990; Endress, 1994). A relação entre flor e visitante é estabelecida, na maioria das vezes, por meio de um atrativo (recurso floral). Para ser efetivo, um recurso deve satisfazer a necessidade de alimentação (néctar, pólen ou óleos florais), reprodução (fragrâncias florais) ou construção de ninho (resinas, ceras ou gomas). Assim, a planta precisa de visitantes que possuam um ajuste físico ideal às flores e que sejam capazes de carregar os grãos de pólen, além de forragear no período adequado e apresentar o comportamento correto. De forma geral, as plantas são selecionadas para alcançarem esses objetivos, ou seja, devem ter flores com morfologia, atrativos (coloração e odor) e recursos adequados. As plantas podem ajustar os seus recursos florais para que os seus visitantes obtenham um lucro mínimo, garantindo assim que o animal visite o maior número possível de flores. Em contrapartida, o visitante deve selecionar as flores, visando o local e o período em que focará para a busca do seu alimento (Agostini; Lopes; Machado, 2014).

Os atributos florais que compõem cada sistema de polinização são um conjunto de adaptações convergentes das flores às particularidades do mecanismo sensorial dos polinizadores e suas características morfológicas, como demonstradas por van der Pijl (1961), ou às características do meio abiótico responsável pela polinização (vento, água). Em suma, a maioria das espécies de plantas com flores podem ser associadas a determinado sistema de polinização. Várias espécies, no entanto, são polinizadas por distintos grupos animais e classificadas como polifílicas, alotrópicas ou generalistas (Endress, 1994; Fenster et al., 2004). Também há espécies vegetais restritivas ou especializadas, que podem ser especializadas por determinado grupo ou diferentes grupos taxonômicos, como observado no gênero *Oenothera* L. (Onagraceae), no sul do Brasil, as quais podem ser polinizadas por Sphingidae, moscas ou abelhas (R.S. Avila, obs. pess.).

A polinização, portanto, é considerada um serviço ecossistêmico, ou seja, está relacionada com a manutenção das interações entre os seres vivos, em áreas naturais, além de ser imprescindível à produção de alimentos (Nunes-Silva; Hrcir; Imperatriz-

Fonseca, 2010; Freitas; Silva, 2016). Cerca de 75% da alimentação consumida pelos seres humanos depende direta ou indiretamente de plantas polinizadas ou com acréscimo no seu sucesso reprodutivo através da polinização biótica (Klein et al., 2007). A polinização é realizada principalmente por abelhas e proporciona um serviço ambiental tanto para os ecossistemas naturais como para os agroecossistemas (Arias-Suárez; Ocampo-Pérez; Urrea-Gómez, 2014). Ao visitarem as flores em busca de recursos, as abelhas podem levar aderidos ao seu corpo os grãos de pólen das anteras para o estigma de outras flores, favorecendo dessa forma a polinização e a fertilização cruzada (Imperatriz-Fonseca; Nunes-Silva, 2010). Os visitantes florais, a partir de sua abordagem à flor, podem ser caracterizados como: polinizadores e/ou pilhadores, a caracterização destes depende do tamanho corporal, comportamento e contato com as estruturas reprodutivas ao coletarem o recurso, com potencial efeito no sucesso reprodutivo da planta, além da morfologia floral que pode selecionar determinado sistema de polinização (Benevides; Gaglianone; Hoffmann, 2009; Yamamoto et al., 2012).

Sobre a morfologia das flores que funciona restringindo o acesso ao pólen por visitantes pode ser encontrado nas flores com quilha (*keel blossoms*), em que a corola pentâmera possui pétalas diferenciadas em um estandarte, duas alas (asas) e uma quilha, esta última formada por duas pétalas, nas quais as estruturas reprodutivas ficam abrigadas (Westerkamp, 1997b), que impedem um livre acesso dos visitantes florais ao pólen, desse modo, é necessário um comportamento específico de forrageio para contatar as estruturas reprodutivas. As flores com quilha são características de muitas espécies pertencentes à família Leguminosae (Westerkamp, 1997a), especialmente na subfamília Papilionoideae.

Papilionoideae é considerada monofilética e a maior das subfamílias dentro da família Leguminosae (Lewis et al., 2005; LPWG, 2013). As espécies desta subfamília apresentam características florais distintas e bem elaboradas, que resultaram em uma diversidade de mecanismos de polinização (Stirton, 1981). Dentro dessas características, são destacadas as adaptações de suas flores para serem visitadas por insetos, como: perfume adocicado, antese diurna, cores vistosas e oferta de diferentes recursos florais (Endress, 1994), sendo esses atributos relacionados ao sistema de polinização por abelhas (Faegri; van der Pijl, 1979).

De acordo com dados da FAO (2014) o estudo do comportamento dos polinizadores em flores, é uma questão fundamental a qualquer investigação em biologia da polinização. O comportamento nas flores, a morfologia, assim como o hábito de vida do inseto, são aspectos a serem considerados para uma polinização eficiente. Além destes, aspectos como a verificação da deposição, dispersão e transferência de pólen, a eficácia da polinização, a utilização de recursos pelos visitantes, os recursos disponíveis, a frequência de polinizadores, a composição da comunidade de polinizadores e suas atividades, considerando os aspectos climáticos, também devem ser verificados (Potts, 2005; Witter et al., 2014). Assim, o desenvolvimento de pesquisas sobre a identificação dos visitantes florais e de seus aspectos comportamentais torna-se de extrema importância para a manutenção e a conservação destes em ambientes agrícolas.

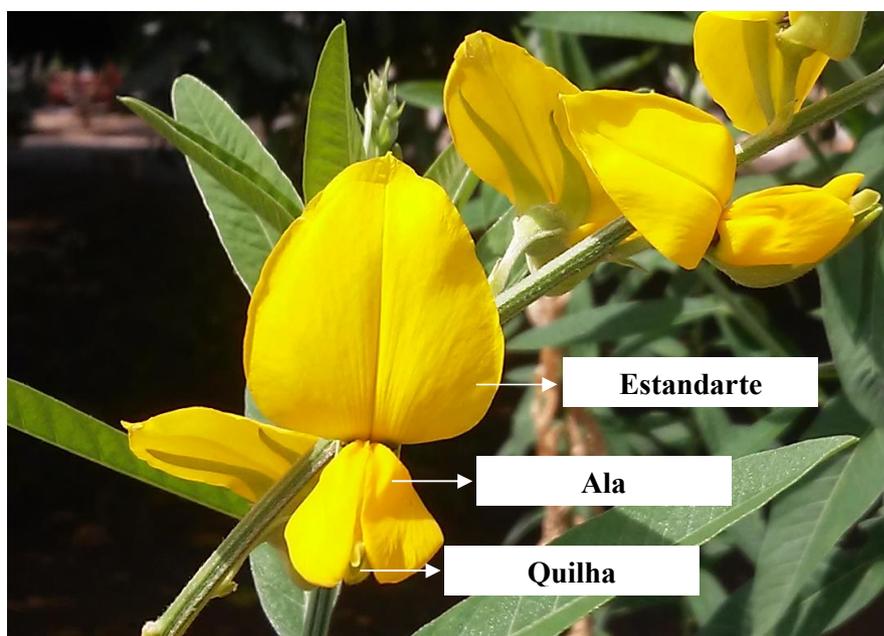
Em *Crotalaria juncea* L., espécie pertencente à família Leguminosae e à subfamília Papilionoideae, comumente utilizada em áreas agrícolas com a finalidade de adubação verde, o sistema de polinização por abelhas é o mais provável devido às características florais da espécie. Flores visitadas por abelhas geralmente apresentam coloração azul, amarela ou púrpura, plataforma de pouso, antese diurna e oferta de diferentes recursos florais (néctar, pólen) (Faegri; van der Pijl, 1980; Pinheiro et al., 2014), portanto, as flores da espécie em estudo possuem alta probabilidade de pertencerem ao sistema de polinização por abelhas. Dessa forma, o objetivo desse capítulo é relacionar a morfologia e biologia floral com o polinizador específico da espécie *C. juncea*. Sendo assim, as seguintes questões foram consideradas: (1) O período de antese floral em *C. juncea* influencia o número de visitas? (2) A quilha presente na flor de *C. juncea* tem efeito no processo de liberação dos grãos de pólen? (3) O período de receptividade estigmática pode indicar uma característica ecológica ao gênero *Crotalaria*? (4) Há diferença estatística no número de grãos de pólen entre os diferentes morfos de anteras de *C. juncea*? (5) Os diferentes morfos de anteras de *C. juncea* apresentam diferença estatística em relação à viabilidade polínica? (6) Qual o período do dia com maior número de visitas nas flores de *C. juncea*?

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 A espécie *Crotalaria juncea* L.

Originária da Índia, a *C. juncea* é uma leguminosa de hábito arbustivo ereto, que pode atingir uma altura média de três metros (Graner et al., 1973). As flores são amarelas (Figura 1), pentâmeras e bissexuais, distribuídas em inflorescências que podem conter de 4 a 20 flores (RICCI, N.A.P., obs. pess., 2016). Oferece como recursos o néctar e o pólen, tendo como polinizadores principais as abelhas de grande porte (mamangavas) (Silva et al., 2009). Possui baixo índice de autocompatibilidade (Graner et al., 1973), com floração máxima no período de 120 dias após o plantio (Salgado et al., 1987). A melhor época de plantio é entre os meses de outubro a novembro, podendo ser realizada até março (Araújo, 2008).

**Figura 1.** Flor de *C. juncea*, mostrando as diferentes pétalas que compõem a corola (estandarte, ala e quilha). A corola possui coloração amarela, antese diurna e é pentâmera (corola composta por cinco pétalas). As flores estão dispostas em inflorescências que contêm de quatro a 20 botões florais e apresentam abertura floral do tipo acrópeta.



Fonte: 1. Própria autoria.

## 2.2 Local de estudo

O estudo foi desenvolvido em um plantio de *C. juncea*, na área urbana do município de Santa Bárbara d'Oeste (22°44'21.9"S; 47°21'22.6"W). O experimento foi instalado em uma área de aproximadamente 5.000m<sup>2</sup>, com 120 indivíduos (Figura 2), divididos em dois canteiros de dimensões 3m x 2m, com espaçamento das sementes de 0,3m x 0,3m e três sementes em cada ponto. O plantio foi realizado em dezembro de 2015, e a floração da espécie ocorreu na primeira semana de fevereiro de 2016.

**Figura 2.** Área verde, no município de Santa Bárbara d'Oeste - SP, no qual foi realizado o plantio de *C. juncea* e o plantio de quiabo, situado próximo ao local estudo, indicados pelas setas (a Figura 2 mostra o local de estudo 30 dias após o plantio de *C. juncea* – data: 01/01/2016).



Fonte: 2. Própria autoria.

Nas áreas localizadas ao lado da plantação de *C. juncea*, havia: uma área com plantação de quiabo de 35m<sup>2</sup> (Figura 2), além de várias espécies como flamboyant-vermelho, urucum, ipê-de-jardim, resedá, maracujá-azedo, mangueira e plantação de milho. Ao redor das áreas de plantio, a vegetação é composta por gramíneas. A área verde pertence à Prefeitura Municipal de Santa Bárbara d'Oeste, e todas as espécies plantadas no local foram realizadas pelos moradores. O local de estudo não apresenta remanescentes florestais nas áreas próximas ao cultivo. A classificação do clima é Cfa (clima temperado úmido com verão

quente), segundo Köppen. A altitude do local do plantio de *C. juncea* foi de 626m. De acordo com a climatologia de precipitação do INPE, entre janeiro e março de 2016, a pluviosidade no município foi de 300 a 400mm. Vale ressaltar que os meses mais quentes, durante as etapas realizadas em campo, foram janeiro e fevereiro de 2016, com temperatura média de 25°C (CEPAGRI, 2016).

## 2.3 Biologia floral de *Crotalaria juncea*

### 2.3.1 Antese

Para analisar o tempo de antese floral de *C. juncea* foram marcadas n=10 flores de diferentes indivíduos e as mesmas foram observadas desde a abertura até a senescência do botão floral, em fevereiro e março de 2016. Detectaram-se seis estágios de desenvolvimento das flores (Figura 3), porém o estágio 1 não foi considerado para posteriores análises por estar em processo de desenvolvimento do botão floral, assim como o estágio 6, por estar em fase de senescência floral.

**Figura 3.** Estágios de desenvolvimento floral de *C. juncea*: (1) botão floral, (2) 24h da antese floral, (3) 48h da antese floral, (4) 72h da antese floral, (5) 96h e início da senescência floral - estandarte, alas e quilha começam a murchar, (6) 120h e senescência floral completa – estandarte, alas e quilha estão completamente murchos e a coloração muda de amarelo para alaranjado.



Fonte: 3. Própria autoria.

### **2.3.2 Caracterização das estruturas reprodutivas e da quilha de *Crotalaria juncea***

Embora as anteras das flores de *C. juncea* tenham tamanho suficiente para serem visualizadas em microscópio de luz, a microscopia eletrônica de varredura permite uma análise mais detalhada de toda a estrutura. Para tanto, foram utilizadas flores fixadas em FAA (5% de formalina, 5% de ácido acético e 90% de álcool etílico a 70%), desidratadas numa série de álcool (10%, 30%, 50% e 70%) e acetona (90% e 100%). As amostras foram submetidas ao ponto crítico para a retirada de toda a água estrutural, por meio do equipamento Balzers Critical Point Dryer 030<sup>®</sup>. Posteriormente, foram recobertas com ouro pelo método de “Sputtering”, com o equipamento Balzers Sputter Coater 050<sup>®</sup>. As micrografias foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura Hitachi TableTop Microscope TM3000<sup>®</sup>, operando a 15kV. A etapa de análise das estruturas reprodutivas e da quilha das flores de *C. juncea*, com a microscopia eletrônica de varredura, foi realizada no laboratório de microscopia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Campus de Rio Claro/SP.

### **2.3.3 Receptividade estigmática**

O teste de receptividade estigmática, utilizando peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 3% (Kearns; Inouye, 1993), consiste em verificar se o estigma da flor está receptivo ao grão de pólen. Para constatar a receptividade deve ocorrer a ação de esterases nos estigmas receptivos, que pode ser visualizada pela liberação de O<sub>2</sub> e consequente formação de bolhas. Foram utilizadas flores de *C. juncea* coletadas aleatoriamente (três flores para cada estágio de antese). A coleta do material foi realizada no plantio de *C. juncea*, e a análise da receptividade estigmática, no laboratório de biologia da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Campus de Araras/SP.

### **2.3.4 Contagem de grãos de pólen em diferentes morfos de anteras**

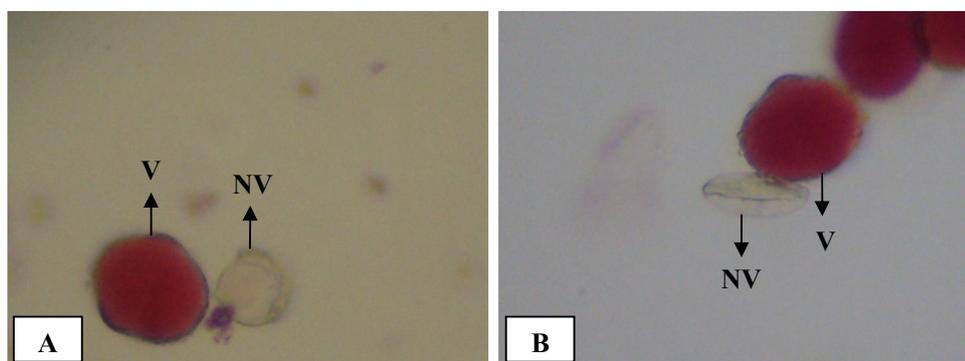
Para estimar a quantidade total de grãos de pólen nos diferentes morfos de anteras, foi coletado todo o grão de pólen de uma antera de morfo alongado e de uma antera de morfo arredondado, em n=10 flores de *C. juncea*. Para cada flor, os grãos de pólen de cada antera foram colocados em Eppendorf com 10 gotas de álcool etílico a 70%. Após a agitação do

Eppendorf retirou-se uma gota da solução, que foi colocada sobre uma lâmina de vidro, e esta foi observada por meio do método de varredura da lâmina, em microscópio de luz. Todos os grãos de pólen da lâmina foram contabilizados com o auxílio de um contador. Estimou-se a quantidade total de grãos de pólen na solução do Eppendorf, multiplicando o total encontrado em uma gota retirada da solução pelo total de gotas da solução. Para estimar a quantidade de grãos de pólen, nos diferentes morfos de anteras, multiplicou-se o total resultante do Eppendorf (referente a uma antera) pela quantidade de anteras daquele morfo específico, na flor de *C. juncea*. As flores de *C. juncea* possuem cinco filetes com anteras com tecas alongadas e cinco filetes com anteras com tecas arredondadas (heteranteria), então, para verificar se houve diferença entre a quantidade de grãos de pólen contabilizados nos diferentes morfos de anteras (n=10), aplicou-se o teste t pareado a 5%, por meio do software R versão 3.1.1<sup>®</sup> (Gentleman et al., 2014). A coleta do material foi realizada no plantio de *C. juncea*, e a contagem dos grãos de pólen, no laboratório de biologia da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Campus de Araras/SP.

### 2.3.5 Viabilidade polínica

Para estimar a viabilidade polínica de *C. juncea* foi utilizada a técnica de coloração dos grãos de pólen com o corante carmim acético a 2% (Radford et al., 1974). No experimento, utilizaram-se três estágios de abertura da flor (estágios 2, 3 e 4), com 10 repetições cada. Para cada flor, uma amostra de pólen foi retirada das anteras e distribuída sobre uma lâmina de vidro, sobre a qual foi adicionado o corante carmim acético e, posteriormente, uma lamínula. Para evitar o ressecamento do material, a observação e registro de grãos de pólen deram-se após o preparo das lâminas. Foi empregado método de varredura da lâmina em microscópio de luz, e contados 100 grãos de pólen da lâmina. Estimou-se o percentual de viabilidade do pólen, mediante a proporção entre o número de grãos de pólen corados (viáveis) e não corados ou com o citoplasma retraído (não viáveis) (Figuras 4A-B). O método foi utilizado tanto para as anteras com tecas alongadas quanto para as anteras com tecas arredondadas, pois há diferentes morfos de anteras em *C. juncea*. Os dados foram submetidos à análise estatística ANOVA e Tukey, ao nível de significância de 5%, utilizando-se o software R versão 3.1.1. A coleta do material foi realizada no plantio de *C. juncea*, e o teste de viabilidade polínica, no laboratório de biologia da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Campus de Araras/SP.

**Figura 4.** Grãos de pólen no teste de coloração carmim acético: (A) grão de pólen viável (V) e não viável (NV) do filete com morfo das tecas das anteras arredondado, e (B) grão de pólen viável (V) e não viável (NV) do filete com morfo das tecas das anteras alongado. Aumento do microscópio de luz = 400x.



Fonte: 4A-B. Própria autoria.

#### 2.4 Frequência e comportamento dos visitantes florais de *Crotalaria juncea*

Para determinar a frequência dos visitantes florais, ao longo do dia, nas flores de *C. juncea*, foram observadas  $n=10$  flores para cada um dos três estágios florais (estágios 2, 3 e 4), pois são nessas fases que ocorre maior atividade de forrageamento. As observações foram realizadas ao longo de três semanas consecutivas de fevereiro de 2016 (cinco dias, das 6:00h às 18:00h, e dez dias, das 10:00h às 18:00h). Foram calculadas a média e o desvio padrão de visitas ao longo do dia para cada um dos estágios florais, tal como o teste de normalidade de Shapiro-Wilk e o teste estatístico ANOVA, por meio do software R, com o objetivo de constatar se houve diferença significativa entre as médias de visitas, ao longo dos três estágios florais. Para relacionar o comportamento do visitante com a morfologia floral foram realizadas observações, *in situ*, do comportamento de abordagem do visitante em relação à flor. Foi verificado se o visitante alcançava o recurso floral e se nesse momento tocava nas estruturas reprodutivas.

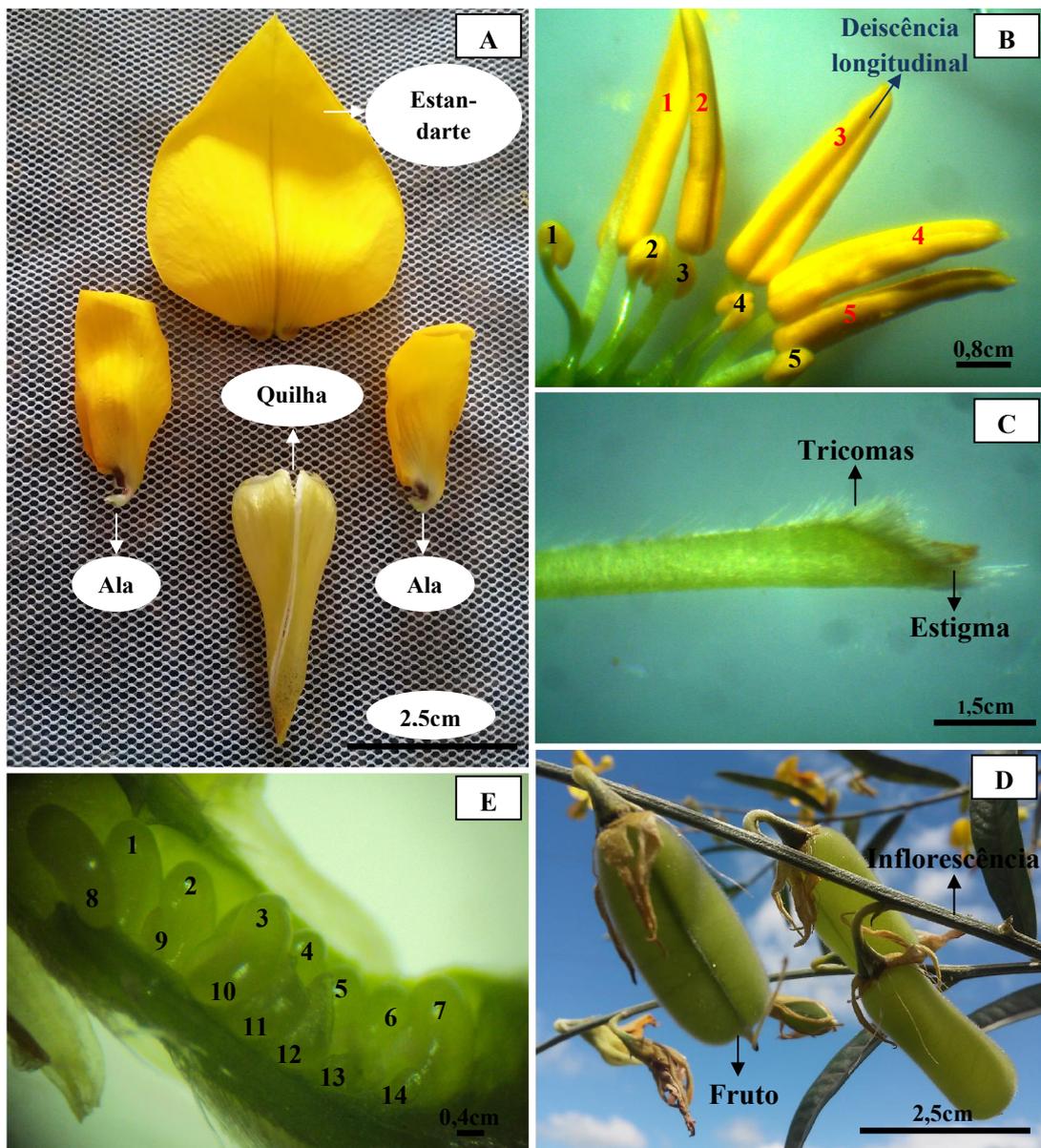
### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Características morfológicas, florais e dos frutos de *Crotalaria juncea*

O cálice é dialissépalo, com quatro sépalas. A corola é composta por cinco pétalas de coloração amarela, divididas em um estandarte, duas alas e duas pétalas fundidas que formam a quilha (Figura 5A), que têm como função abrigar e proteger as

estruturas reprodutivas da flor, restringindo o acesso aos visitantes e à coleta dos recursos florais. Possui simetria zigomorfa (bilateral) e pétalas livres entre si (dialipétala). Os dez estames são livres, eretos, de coloração verde e possuem heteranteria, sendo cinco filetes com as tecas das anteras arredondadas e cinco filetes com as tecas das anteras alongadas, ambas com deiscência longitudinal (Figura 5B). O pólen é viscoso e de coloração amarela. O estigma possui coloração esverdeada e a superfície é composta por tricomas, com maior quantidade no seu ápice (Figura 5C). Os frutos são do tipo vagem, de formato cilíndrico, coloração verde e com a superfície coberta por tricomas (aparência aveludada) (Figura 5D). O ovário possui óvulos dispostos linearmente e em duas fileiras (Figura 5E).

**Figura 5.** A. Peças florais de *C. juncea* (estandarte – pétala maior, alas – pétalas laterais da corola e quilha – duas pétalas fundidas que abrigam e protegem as estruturas reprodutivas – dez anteras e um estigma). B. Filetes com tecas das anteras arredondadas (numeração em preto) e alongadas (numeração em vermelho). Deiscência longitudinal das anteras indicada com a seta azul. C. Ápice do estilete recoberto por tricomas. D. Inflorescência com os frutos (vagens) formados. E. Corte longitudinal do ovário – as numerações em preto indicam os óvulos, que apresentam distribuição linear e estão organizados em duas fileiras.



Fonte: 5A-E. Própria autoria.

## 3.2 Biologia floral de *Crotalaria juncea*

### 3.2.1 Antese

A abertura dos botões florais de *C. juncea* tem início às 10:00h e permanece até às 18:00h, durante três dias consecutivos (Figura 2). Nos estágios 5 e 6 (Figura 2), a flor inicia a senescência, ou seja, as peças da corola murcham, a coloração amarela torna-se mais escura e as flores não apresentam o processo de abertura e fechamento da corola, que ocorre nos estágios anteriores. A sequência de abertura dos botões florais nas inflorescências inicia-se com os botões situados na posição basal da inflorescência (próxima à planta-mãe) e o botão floral situado ao ápice da inflorescência é o último a se abrir, caracterizando a sequência de abertura das flores como acrópeta (Figura 6).

**Figura 6.** Abertura sequencial dos botões florais (acrópeta), na inflorescência de *C. juncea*. Note que as flores situadas na posição basal da inflorescência estão abertas, enquanto os botões florais situados nas posições mediana e apical encontram-se fechados.

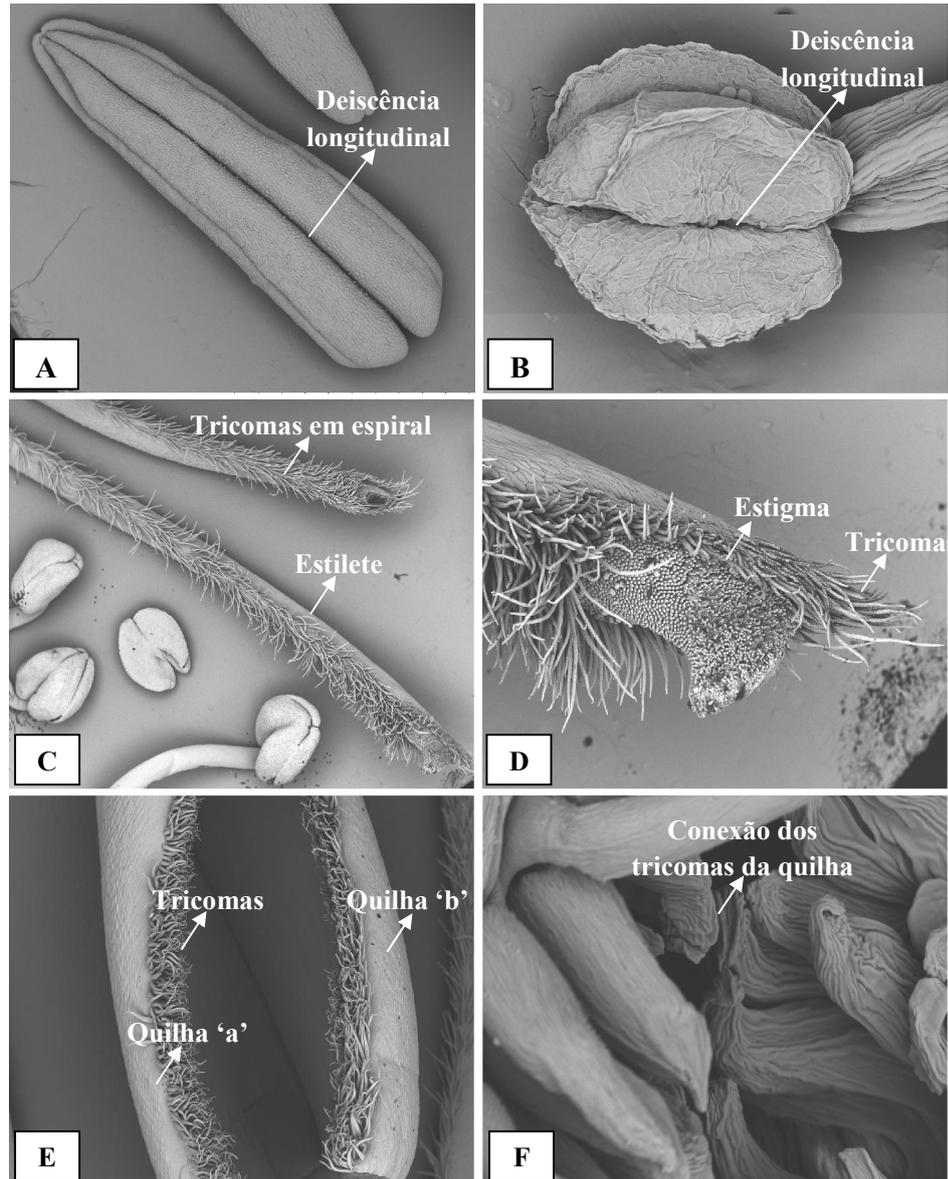


Fonte: 6. Própria autoria.

### 3.2.2 Caracterização das estruturas reprodutivas e da quilha de *Crotalaria juncea*

Com a microscopia eletrônica de varredura constatou-se que as flores de *C. juncea* são heterânteras, ou seja, apresentam diferentes morfos de anteras, sendo cinco anteras com tecas alongadas (Figura 7A) e cinco anteras com tecas arredondadas (Figura 7B), ambas com deiscência longitudinal. O estilete apresenta comprimento superior aos filetes e a distribuição dos tricomas em sua superfície ocorre de forma espiral, desde a base até o ápice (estigma) (Figura 7C). O estigma possui um formato de gancho, que pode estar ligado ao movimento de bombeamento dos grãos de pólen pelo ápice da quilha, no momento de forrageio da abelha *Xylocopa frontalis* (Figura 7D). A quilha da flor de *C. juncea* é coberta por grande quantidade de tricomas, e é composta por duas pétalas fundidas (Figura 7E), de modo que os tricomas da quilha unem-se pelas extremidades, permitindo a abertura da quilha e exposição das estruturas reprodutivas, durante o forrageio de *X. frontalis* (Figura 7F).

**Figura 7.** (A) Antera alongada de *C. juncea*, evidenciando as tecas e a deiscência longitudinal do morfo (comprimento = 2mm, aumento = 400x) (B) Antera arredondada, mostrando as tecas e a deiscência longitudinal do morfo (comprimento = 300 $\mu$ m, aumento = 3000x) (C) Estilete, evidenciando a grande quantidade de tricomas em sua superfície (comprimento = 2mm, aumento = 300x) (D) Superfície estigmática, coberta por grande quantidade de tricomas. Note que o estigma possui um formato de gancho, que pode estar ligado ao movimento de bombeamento dos grãos de pólen pelo ápice da quilha (comprimento = 500 $\mu$ m, aumento = 1200x) (E) Quilha da flor, coberta por grande quantidade de tricomas (comprimento = 2mm, aumento = 500x) (F) Os tricomas da quilha unem-se pelas extremidades, permitindo a abertura da quilha e exposição das estruturas reprodutivas, durante o forrageio da *X. frontalis* (comprimento = 50 $\mu$ m, aumento = 1500x).

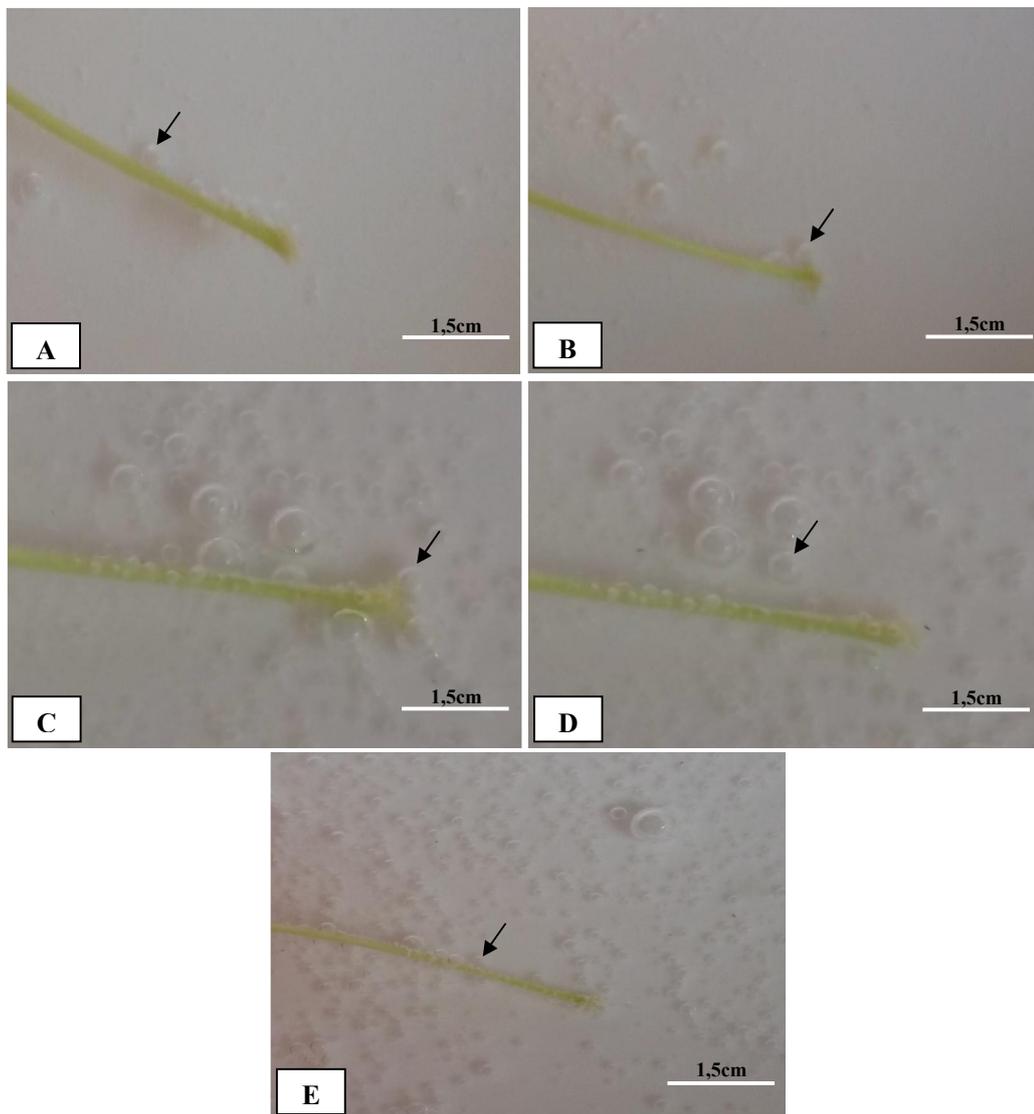


Fonte: 7A-F. Própria autoria.

### 3.2.3 Receptividade estigmática

No teste de receptividade estigmática foi constatado que os estigmas de *C. juncea* estão receptivos desde o estágio 1 até o estágio 5 (início da senescência floral) (Figuras 8A-E), e pode-se observar a formação de bolhas, nos estigmas, durante o teste de receptividade estigmática.

**Figura 8.** Teste de receptividade dos estigmas de *C. juncea*: nos estágios 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D) e 5 (E). As setas correspondem às bolhas formadas durante a submersão do estilete, em peróxido de hidrogênio a 3%.



Fonte: 8A-E. Própria autoria.

### 3.2.4 Contagem de grãos de pólen em diferentes morfos de anteras

Foi obtida diferença significativa entre o número de grãos de pólen nos diferentes morfos de anteras, com base no valor do teste t pareado ( $t=1,8^9$ ,  $p<0,001$ ) (Quadro 1). A variância do número de grãos de pólen entre as anteras com tecas alongadas foi de  $2,15^8$ . Entre as anteras com tecas arredondadas obteve-se uma variância de  $1,44^8$ .

**Quadro 1.** N° total de grãos de pólen e média  $\pm$  desvio padrão, em diferentes morfos de anteras, em *C. juncea* (10 anteras para cada um dos morfos)

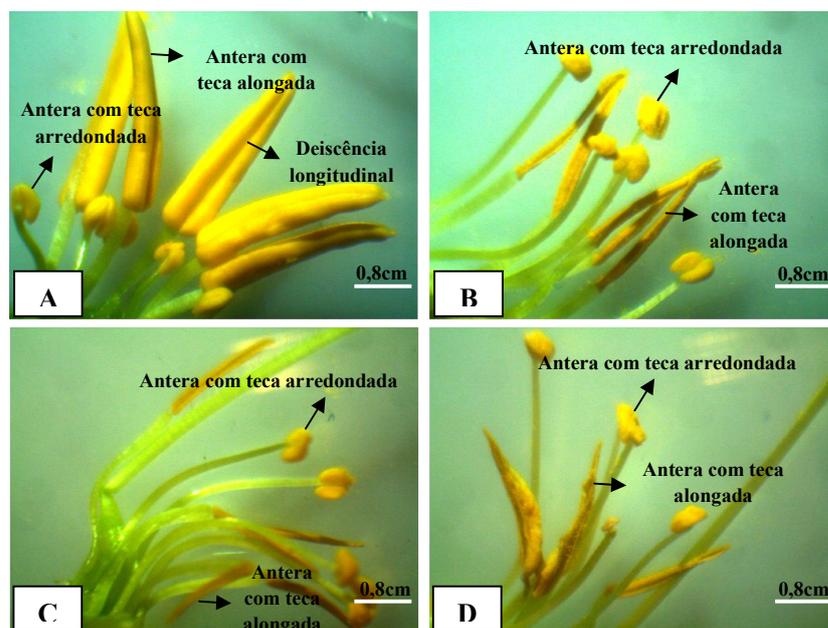
<b>Flores</b>	<b>Anteras com tecas alongadas</b>	<b>Anteras com tecas arredondadas</b>
Flor 1	223.200	65.250
Flor 2	212.750	64.600
Flor 3	237.200	61.800
Flor 4	201.150	70.100
Flor 5	220.500	93.950
Flor 6	248.500	59.950
Flor 7	205.800	56.700
Flor 8	222.300	69.000
Flor 9	222.900	50.150
Flor 10	237.050	55.550
<b>média<math>\pm</math>desvio-padrão</b>	<b>223.135<math>\pm</math>14.660a</b>	<b>64.705<math>\pm</math>11.990b</b>

Médias com letras diferentes diferem estatisticamente entre si a  $p<0,05$ .

As flores de *C. juncea* são um exemplo de heteranteria e heterostemonia, contendo cinco filetes com maior comprimento e cinco filetes com menor comprimento. No estágio de botão floral (estágio 1) (Figura 9A), os filetes com menor comprimento são os que possuem

as anteras com tecas arredondadas, enquanto os filetes com comprimento maior são os que possuem anteras com tecas alongadas. Nos estágios 2 e 3 (Figuras 9B-C), quando as flores já estão abertas, e as anteras iniciam a liberação dos grãos de pólen, percebeu-se que os filetes com menor comprimento, no estágio 1, tiveram um crescimento no comprimento e igualaram-se aos filetes com maior comprimento, porém o tamanho das tecas das anteras não alterou-se. No estágio 4 (Figura 9D), os filetes com tecas das anteras arredondadas ultrapassaram o comprimento dos filetes com as tecas das anteras alongadas. Vale ressaltar que cada antera possui duas tecas e deiscência longitudinal (Figura 9A).

**Figura 9.** Flor de *C. juncea* evidenciando os diferentes estágios de desenvolvimento do androceu – (A) estágio 1: botão floral com a deiscência longitudinal: filetes das anteras com tecas arredondadas estão num comprimento menor em relação ao comprimento dos filetes das anteras com tecas alongadas, e as tecas das anteras ainda não estão liberando os grãos de pólen (B) estágio 2: filetes das anteras com tecas arredondadas igualam-se ao comprimento dos filetes das anteras com tecas alongadas e a fenda longitudinal entre as tecas inicia a liberação dos grãos de pólen (C) estágio 3: filetes das anteras com tecas arredondadas ainda possuem o mesmo comprimento dos filetes das anteras com tecas alongadas (D) estágio 4: filetes das anteras com tecas arredondadas ultrapassam o comprimento dos filetes das anteras com tecas alongadas. Aumento do microscópio de luz = 45x.

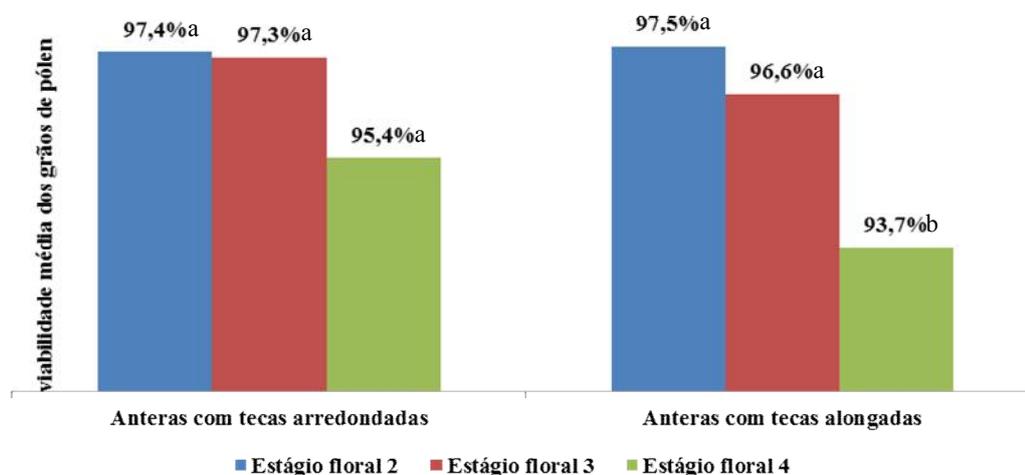


Fonte: 9A-D. Própria autoria.

### 3.2.5 Viabilidade polínica

Não foi observada diferença significativa na viabilidade dos grãos de pólen nas anteras com tecas arredondadas ( $F_{[2,27]}=2,884$ ,  $p=0,073$ ), porém houve diferença significativa nas anteras com tecas alongadas ( $F_{[2,27]}=9,258$ ,  $p<0,001$ ) (Figura 10). Com o teste de Tukey foi obtida a diferença entre os estágios 2 e 4 ( $p=0,010$ ) e entre os estágios 3 e 4 ( $p<0,001$ ).

**Figura 10.** Viabilidade média (%) dos grãos de pólen de *C. juncea*, nos diferentes estágios florais (2, 3 e 4), em diferentes morfos de anteras (anteras com tecas arredondadas e anteras com tecas alongadas).



Médias com letras diferentes diferem estatisticamente entre si a  $p<0,05$ .

### 3.3 Frequência e comportamento dos visitantes florais de *Crotalaria juncea*

Ao longo das 140 horas de observação em campo, só foram constatadas visitas de *Xylocopa frontalis* (Olivier, 1789) (Hymenoptera, Apidae) às flores de *C. juncea*. No momento da visita, *X. frontalis* agarra-se à flor com as pernas anteriores e medianas (Figura 11) e, desta forma, dois movimentos ocorrem concomitantemente nas alas: o movimento para trás e lateralmente. Esse movimento lateral libera a passagem para o néctar, inicialmente fechado pelas alas, e as peças bucais de *X. frontalis* são inseridas no centro do nectário. Com a estrutura de quilha e alas movendo-se, a parte distal abre-se e, os órgãos reprodutivos, que são imóveis, são finalmente expostos. Durante a liberação dos grãos de pólen, o estigma, que contém pequenos tricomas, fricciona nas anteras e aglutina grande quantidade de pólen viscoso em sua superfície. O estigma, contendo os grãos de pólen, é liberado pelo ápice da quilha e adere-se à região torácica e abdominal ventral e pernas anteriores e medianas de *X.*

*frontalis*. Quando o visitante abandona a flor, todas as estruturas reprodutivas retornam à posição inicial.

**Figura 11.** Vista lateral de um indivíduo de *X. frontalis*, ao pousar na flor para coletar néctar. Note os pares de pernas anteriores e medianas agarrando as alas da corola de *C. juncea*, indicado na seta.

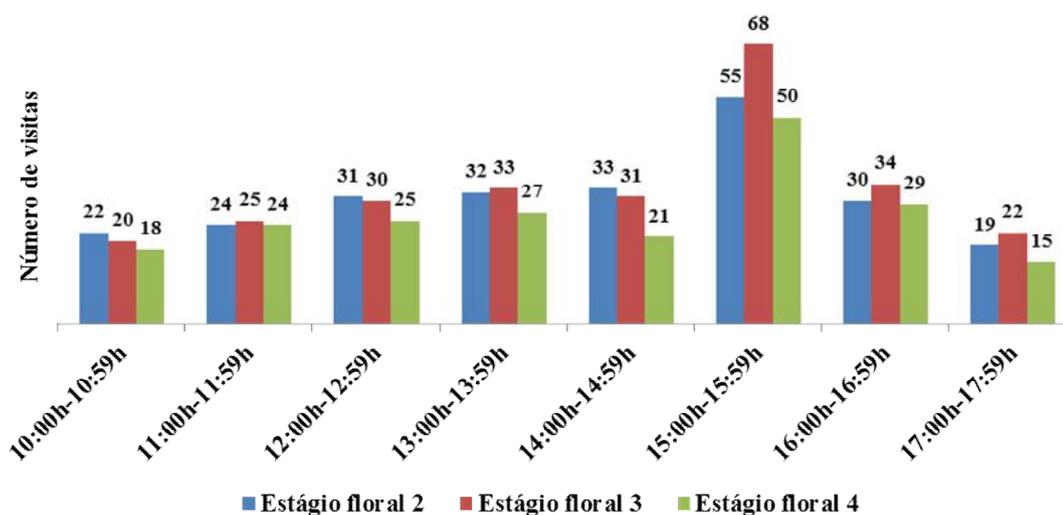


Fonte: 11. Própria autoria.

Nos estágios florais 2, 3 e 4, obteve-se uma média de visitas de 30,75, 32,88 e 26,10, respectivamente. Por meio do teste estatístico ANOVA foi observado que não houve diferença significativa ao compararmos os valores obtidos nos estágios florais 2, 3 e 4 ( $F_{[2,21]}=0,615873$ ,  $p=0,549642$ ).

Ao conferirmos qual foi o período do dia em que houve maior forrageamento dos visitantes florais, nas flores de *C. juncea*, entre às 15:00h e às 15:59h foi o mais representativo, aos estágios 2, 3 e 4 ( $n=55$ ,  $n=68$  e  $n=50$ ), respectivamente (Figura 12).

**Figura 12.** Número de visitas de *X. frontalis* em *C. juncea*, por período do dia, nos estágios florais 2, 3 e 4 (n=10 flores por estágio).



## 4. DISCUSSÃO

### 4.1 Biologia floral de *Crotalaria juncea*

#### 4.1.1 Antese

A antese floral de três dias consecutivos e num período de oito horas diárias (das 10:00h às 18:00h), pode indicar uma estratégia ecológica e reprodutiva da espécie, pois ao mesmo tempo há um gasto energético na produção de recurso floral (néctar) e no processo de abertura e fechamento da corola por três dias. No entanto, possibilita maior tempo de forrageio por *X. frontalis*, ocorrendo maior transferência de grãos de pólen provenientes de outras flores e maior probabilidade de fecundação das oosferas, culminando na produção de sementes, formação do fruto e no sucesso reprodutivo. Primack (1985) relata que o período de tempo que uma flor permanece aberta, com seu perianto e estruturas reprodutivas vistosas, é um fator importante para a compreensão da ecologia da polinização como um processo dinâmico, ou seja, o tempo de antese floral influencia no forrageio dos polinizadores e no número de visitas que pode ocorrer. Além disso, a longevidade floral reflete o número de flores em antese, no indivíduo, na eficácia das flores em atrair os polinizadores aos recursos e na transferência cruzada dos grãos de pólen, podendo conduzir ao sucesso reprodutivo da espécie.

#### 4.1.2 Caracterização das estruturas reprodutivas e da quilha de *Crotalaria juncea*

A tribo Crotalarieae (Benth.) Hutch. (Leguminosae, Papilionoideae), onde está situada a espécie *C. juncea*, é parte do core Genistoide (Crisp et al., 2000), e compreende aproximadamente 1.204 espécies (van Wyk, 2005), com delimitações dentro da tribo que podem ser resultado das mudanças morfológicas e quimiotaxonômicas (van Wyk; Schutte, 1995), e da sistemática molecular (Boatwright et al., 2008a, 2009, 2011).

**a) Anteras:** As flores de *C. juncea* são heterostêmones, ou seja, apresentam ao menos dois distintos tamanhos de estames, que podem variar em tamanho ou formato do filete, inserção do filete na antera, tamanho da antera ou coloração da antera (Tucker, 1996a; Vallejo-Marín et al., 2009; Paulino et al., 2013). A presença de estames heteromórficos está geralmente associada ao enantiomorfismo, polinização por vibração, deiscência poricida das anteras, polinização por abelhas e ausência de nectários florais (Buchmann, 1983; Luo et al., 2008; Vallejo-Marín et al., 2010; Almeida et al., 2013, 2015), e, provavelmente evoluiu via seleção mediada por polinizadores, com o objetivo de reduzir o conflito causado por diferentes funções polínicas (Vallejo-Marín et al., 2010). De acordo com o mesmo autor, estames heteromórficos são encontrados em 16 famílias distribuídas em 12 ordens (mais de 24.000 espécies), e entre essas famílias, Leguminosae apresenta maior riqueza de espécies heterostêmones. De acordo com Barrett (2010), a subfamília Caesalpinoideae é um dos grupos de angiospermas que mais apresentam distintos tipos de estames por flores. Contudo, estudos verificaram que a maioria de gêneros com flores heterostêmones foi encontrada na subfamília Papilionoideae, em que está posicionada a espécie *C. juncea* (Barroso, 1991; Endress, 1994; Rodriguez-Riaño et al., 1999a,b; Mansano; Souza, 2004; Prenner, 2004a,b; Filardi et al., 2007).

**a) Anteras:** Os membros da tribo Crotalarieae, e conseqüentemente a espécie *C. juncea*, têm arranjos de anteras distintos (Polhill, 1976), que são informativos em nível genérico (Boatwright et al., 2008b; Boatwright; van Wyk, 2009). Espécies com quilha tendem a ter anteras monomórficas (os gêneros que invariavelmente têm estilos retos ou curvados para baixo) ou anteras dimórficas (estilos arredondados ou alongados) com um arranjo de (1) quatro anteras longas basifixas e seis anteras dorsifixas mais curtas; (2) quatro anteras basifixas, a antera carinal e cinco anteras dorsifixas mais curtas; (3) anteras marcadamente diferenciadas em cinco anteras longas basifixas e cinco anteras curtas dorsifixas (Polhill, 1976) como verificado na espécie *C. juncea*, sendo que o dimorfismo de antera parece estar diretamente ligado ao grau de torção do ápice da quilha, e é fortemente desenvolvido em espécies do gênero *Crotalaria* (Le Roux; van Wyk, 2012).

**b) Estilete e Estigma:** Polhill (1976) notou diferentes rotas de liberação do pólen em diferentes gêneros dentro da tribo Crotalarieae. Quatro tipos básicos de liberação do pólen, em espécies de Papilionoideae, foram descritos por Delpino (1868, 1869): valvar, explosivo, escova e bombeamento (Delpino, 1868, 1869; Leppik, 1966; Westerkamp, 1997; Etcheverry, 2001a,b). Nas espécies pertencentes ao gênero *Crotalaria*, o pólen é liberado por meio do mecanismo de bombeamento, com o ápice da quilha servindo como um cilindro e o estilete e as anteras atuando como um pistão; o pólen é empurrado e bombeado para fora da quilha, por ação da escova formada pelos tricomas do estilete e estigma (Arroyo, 1981), no momento do forrageio de *X. frontalis* à flor de *C. juncea*, isto é, a escova do estilete e do estigma está sempre presente com tricomas dispostos em direção ascendente na parte distal da quilha (Polhill, 1976, 1982), contribuindo à deposição dos grãos de pólen em *X. frontalis*. Três tipos de distribuições de tricomas são evidentes no gênero *Crotalaria*, ou seja, (1) uma única linha ao longo da borda superior do estilete, (2) duas linhas ao longo dos lados do estilete ou (3) distribuídos em torno do estilete, em espiral, seguindo o grau de torção da quilha, como ocorre em *C. juncea*.

**c) Quilha:** Nas flores onde a quilha é torcida, como ocorre em *C. juncea*, os tricomas são dispostos em espiral, pois seguem o formato do estilete e da quilha (Le Roux; van Wyk, 2012). A estreita relação entre os gêneros *Bolusia* Benth. e *Crotalaria* foi mencionada anteriormente (Polhill, 1976, 1982). A presença da quilha enrolada em *Bolusia* e um ápice de quilha fortemente curvado (tornando-se ligeiramente enrolado) em *Crotalaria cornu-ammonis* R. Viguier parecem fornecer uma ligação entre os dois gêneros (Polhill, 1976, 1982). Os tricomas presentes nas quilhas servem, então, para ligar as duas pétalas da quilha ao longo de suas bordas superiores, e garantir que a quilha proteja o androceu e o gineceu, funcionando como uma única unidade durante a polinização.

#### 4.1.3 Receptividade estigmática

A receptividade estigmática da espécie *C. juncea* permanece desde o botão floral (estágio 1) ao início da senescência floral (estágio 5), corroborando os dados obtidos por Deepika et al. (2015), que encontrou o mesmo padrão de receptividade estigmática, na espécie *Crotalaria laburnifolia* L.. Ambas as espécies pertencem ao mesmo gênero, ou seja, possuem proximidade filogenética, portanto passíveis de comparação. A coincidência da receptividade estigmática, nas duas espécies, pode indicar uma característica ecológica do gênero, isto é, ao

manter o estigma receptivo durante toda a antese floral pode representar um fator importante no processo de polinização e refletir no sucesso reprodutivo.

#### 4.1.4 Contagem de grãos de pólen em diferentes morfos de anteras

Algumas características das flores podem ser interpretadas como adaptações contra uma excessiva retirada de pólen pelas abelhas. Em algumas flores, como do gênero *Senna*, por exemplo, também inserido na família Leguminosae, existe uma divisão de trabalho entre anteras de diferentes tamanhos – heteranteria (Vogel, 1978), enquanto umas anteras depositam grãos de pólen não viáveis, no lado ventral ou nas pernas da abelha, posteriormente coletados para alimentação (fonte proteica), outras depositam os grãos de pólen viáveis sobre o dorso do visitante (caso de quilha invertida), os quais não serão retirados pelo comportamento de limpeza dessas abelhas, e esse é o pólen que será transferido para o estigma de outra flor (Gottsberger; Silberbauer-Gottsberger, 1988; Marazzi; Conti; Endress, 2007). O dimorfismo do androceu, assim como em *C. juncea*, ocorre em algumas espécies com anteras longitudinais (como exemplo, as espécies do gênero *Swartzia*) ou poricidas (como exemplos, as espécies *Senna macranthera* (DC. ex Collad.) H.S. Irwin & Barneby, *Senna multijuga* (Rich.) H.S. Irwin & Barneby e *Tibouchina langsdorffiana* (Bonpl.) Baill. Do ponto de vista evolutivo, a heteranteria tem sido considerada por alguns autores, como uma resposta das plantas para assegurar que haja a reprodução, mas com economia de recurso (Vogel, 1974; Buchmann, 1983; Vallejo-Marín et al., 2009).

Houve diferença na quantidade de pólen produzida entre as anteras de *C. juncea*, refutando o mesmo dado analisado no estudo de Leite (2016), com a espécie *Tibouchina granulosa* (Desr.) Cogn. (Melastomataceae), que também apresenta o padrão de heteranteria, em suas flores. No entanto, corrobora um dado do mesmo estudo, que também analisou os diferentes morfos de anteras da espécie *Tibouchina pulchra* (Cham.) Cogn., e ressalta que as anteras com tecas alongadas contêm mais pólen que as pequenas, provavelmente devido ao tamanho das anteras ser discrepante (alto grau de heteranteria). Em relação à dinâmica de pólen, os resultados com as espécies do gênero *Tibouchina* mostram que o pólen não está totalmente disponível para as abelhas no início da antese, o que difere o resultado desse estudo com a *C. juncea*, em que ambos os morfos de anteras apresentam liberação polínica a partir do primeiro dia de antese floral.

Vallejo-Marín et al. (2014) descrevem que o arranjo espacial dos órgãos reprodutivos em uma flor influencia nas taxas de autopolinização e polinização cruzada, já que a posição do estilete e dos estames pode interferir na deposição de pólen das anteras ao estigma da mesma flor, principalmente se o estilete apresentar comprimento superior ao comprimento dos estames, como é o caso da flor de *C. juncea*, sendo obrigatória a transferência de grãos de pólen das anteras de uma flor emissora ao estigma da flor receptora.

#### 4.1.5 Viabilidade polínica

Num estudo realizado por Coelho et al. (2012), sobre a viabilidade de grãos de pólen em *C. juncea*, foi observado que as médias de porcentagens encontradas variaram entre 96% e 100%, portanto próximas às médias encontradas nesse trabalho. O mesmo estudo não avaliou a porcentagem de viabilidade dos grãos de pólen em diferentes morfos de anteras, portanto, um diferencial em relação aos dados apresentados no presente trabalho. Em *C. juncea* foi visto que os grãos de pólen apresentam alta viabilidade quando submetidos ao teste com o corante carmim acético, em ambos os morfos de anteras (Figuras 3A-B), o que não era esperado segundo a hipótese de divisão de trabalho, comprovada em outros estudos (Müller, 1882; Luo et al., 2008; Vallejo-Marín et al., 2009). Isso pode ser um indicativo da alta probabilidade de que os grãos de pólen de *C. juncea*, quando transferidos aos estigmas de outras flores possam germinar, formar os tubos polínicos e fecundarem os óvulos, contribuindo para o aumento da produção de frutos e sementes e, em áreas agrícolas, a produtividade da cultura.

Salienta-se ainda que o fato de não constatar diferença estatística na viabilidade polínica, nas anteras com tecas arredondadas, indica que o estágio floral não afeta a produção de grãos de pólen viáveis nesse morfo, entretanto nas anteras com tecas alongadas houve diferença estatística, indicando a influência do estágio floral na viabilidade polínica. Sobre isso, Souza, Pereira e Martins (2002) indicam que no momento de abertura da flor, o grão de pólen precisa estar totalmente viável, mas ao longo da antese, a viabilidade polínica tende a diminuir e reduz a sua capacidade de fertilização. Além disso, Giordano, Aragão e Boiteux (2003) relatam que, durante o processo de maturação da planta, a viabilidade polínica também pode ser afetada por fatores endógenos ou exógenos, como o desenvolvimento floral, altas ou baixas temperaturas do ambiente externo, luminosidade, nutrição da planta e uso de insumos agrícolas.

#### 4.2 Frequência e comportamento dos visitantes florais de *Crotalaria juncea*

O entorno da área do plantio de *C. juncea* apresenta outras espécies de Angiospermae, como *Passiflora edulis* Sims. (Passifloraceae), *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench. (Malvaceae), *Bixa orellana* L. (Bixaceae), *Delonix regia* (Hook.) Raf. (Leguminosae, Caesalpinoideae), *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth. (Bignoniaceae), *Mangifera indica* L. (Anacardiaceae) e *Lagerstroemia indica* L. (Lythraceae). Algumas dessas espécies floresceram no mesmo período de *C. juncea*, portanto a alta disponibilidade de recursos florais pode explicar o forrageio de algumas espécies de polinizadores, incluindo as abelhas eussociais, *Apis mellifera* L., 1758 (Apidae, Apini) e *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811) (Apidae, Meliponini) e a abelha de hábito solitário, *X. frontalis*, sendo essa última a espécie observada nas flores de *C. juncea*. *X. frontalis* é uma das principais polinizadoras de *P. edulis* f. *flavicarpa* (maracujá-azedo) e *Passiflora alata* (maracujá-doce) (Passifloraceae) por seu grande porte e abundância nos cultivos. Essas abelhas geralmente nidificam e permanecem nas áreas agrícolas, entretanto, estudos mostram que a espécie pode garantir a polinização natural em áreas mais antropizadas de São Paulo e outros Estados brasileiros (Camillo, 2003; Oliveira Filho; Freitas, 2003). Além disso, Marchi e Alves dos Santos (2013), num levantamento das espécies de flores visitadas por abelhas do gênero *Xylocopa*, no Estado de São Paulo, relatam que *X. frontalis* visita uma grande variedade de espécies em áreas urbanas e agrícolas, incluindo *T. stans*, *D. regia*, *B. orellana* e *C. juncea*, estando essas espécies presentes na área de estudo.

Os resultados obtidos em campo corroboram a hipótese do relacionamento das flores de *C. juncea* com a espécie *X. frontalis*. Várias espécies, em diferentes famílias, incluindo *C. juncea*, apresentam o padrão de flores com quilha, característica que provavelmente surgiu independentemente em cada uma delas (Westerkamp, 1997a), mas tal característica é ainda mais evidente na família Leguminosae, em que esse formato floral define toda a subfamília Papilionoideae (Simpson, 2006). Vários autores sugeriram, ao longo do tempo, diferentes aspectos adaptativos que podem ter levado ao surgimento dessa característica: (1) adaptação para proteger o pólen contra a chuva (Sprengel, 1793), (2) proteção do ovário contra os bicos de aves, no caso de flores originalmente polinizadas por aves (Grant, 1950) ou, ainda, (3) adaptações que surgiram em flores que já eram originalmente polinizadas por abelhas (Faegri; van der Pijl, 1980). No entanto, trabalhos recentes, sugerem que as flores com quilha surgiram como uma adaptação contra uma coleta excessiva de pólen pelas abelhas (Westerkamp, 1997b; Westerkamp; Classen-Bockhoff, 2007).

Outro ponto a ser mencionado é que Westerkamp (1997a) descreve o estandarte como imóvel, pois as dobras na base da pétala tornam a estrutura rígida e fazem com que este seja um dos pontos de maior resistência da flor. A rigidez da pétala faz com que, durante esse movimento de erguer o estandarte, o corpo de *X. frontalis* seja forçado ainda mais para baixo, aumentando a eficiência do mecanismo de exposição do estilete (Amaral-Neto, 2011) e, conseqüentemente, a deposição dos grãos de pólen, no polinizador. Como demonstrado, a interação entre as pétalas, principalmente o estandarte e as alas criam barreiras que não podem ser vencidas pelos bicos dos pássaros, conforme sugerido por Grant (1950), sendo necessária abordagem específica para acessar os recursos florais e, nesse processo, transportar o pólen a outras flores, contribuindo para o sucesso reprodutivo de *C. juncea*.

Conforme os resultados de visitas, ao longo do dia, em flores de diferentes estágios de antese, verificou-se o aumento da média de visitas do estágio 2 ao estágio 3, porém uma diminuição dessa média, no estágio 4. Esses dados podem significar o aumento da disponibilidade de recursos florais, no estágio 3, em especial o néctar, e a redução de recursos florais a partir do estágio 4, pois a flor aproxima-se do início da senescência floral, portanto com menor atrativo floral ao visitante e, conseqüentemente, diminuição do número de visitas. Descarta-se o efeito dos pilhadores na redução do número de visitas de um estágio floral a outro, pois alguns trabalhos relatam os efeitos negativos desse comportamento diminuindo o número de visitas por polinizadores efetivos devido à redução dos recursos disponíveis (Irwin; Brody, 1999; Dedej; Delaplane, 2004), contudo não foram observados pilhadores nas flores de *C. juncea* durante as observações em campo.

O período compreendido entre às 15:00h e 15:59h foi o mais representativo ao número de visitas, aos estágios florais 2, 3 e 4, o que corrobora um estudo realizado por Amaral-Neto (2011), em que o autor verificou os horários de visitas de quatro espécies de abelhas: *Xylocopa grisescens* (Lepeletier, 1841), *Xylocopa cearenses* (Ducke, 1910), *X. frontalis* e *Centris fuscata* (Lepeletier, 1841), em duas espécies pertencentes ao gênero *Crotalaria* (*Crotalaria micans* Link. e *Crotalaria vitellina* Ker Gawl.), e relatou que houve maior número de visitas no período matutino (primeiras horas do dia) e entre às 15:00h e às 18:00h (últimas horas do dia), sendo que esse último período coincide com o período de maior forrageio de *X. frontalis* nas flores de *C. juncea*. Sobre o resultado, o autor infere que os horários de maior visitação podem estar relacionados às temperaturas mais baixas no período matutino e últimas horas do período vespertino, portanto mais propensos ao maior forrageio das espécies de abelhas. Outro ponto a ser discutido é a realização de projetos posteriores para

verificar a dinâmica de produção de néctar na espécie *C. juncea*, podendo compreender o volume de recurso produzido ao longo da antese floral, assim como o horário em que se obtém maior disponibilidade do recurso ao visitante floral. Sobre a dinâmica de néctar na família Leguminosae, subfamília Papilionoideae, pode ser mencionado o trabalho realizado por Agostini (2008), no litoral norte do Estado de São Paulo – Brasil, com duas espécies pertencentes ao gênero *Mucuna*.

Garibaldi (2013), verificando a eficácia de espécies nativas e exóticas de polinizadores, detectou um aumento no desenvolvimento de frutos de muitas culturas agrícolas quando as flores foram polinizadas por espécies nativas, mesmo que as exóticas depositassem grande quantidade de grãos de pólen. Isso ocorre, pois o comportamento das espécies nativas proporciona distribuição efetiva de pólen no estigma e auxilia na polinização cruzada, pelo fato de visitarem flores de indivíduos que estão distantes entre si.

A rápida atuação no momento de forrageio e o grande tamanho corpóreo de *X. frontalis*, indica que a mesma pode ser considerada uma espécie essencial para o desenvolvimento dos frutos e sementes de *C. juncea*. Ademais, a pilosidade na região ventral e as escopas dessa espécie auxiliam na aderência dos grãos de pólen e, ao abordar a flor e contatar as estruturas reprodutivas, podem ser consideradas polinizadoras eficazes, com maior chance de transferência polínica entre as flores, em uma única visita.

## 5. CONCLUSÃO

Conclui-se que a disposição das peças florais de *C. juncea* e o dimorfismo do androceu influenciaram no sistema de polinização por abelhas, pois *X. frontalis* foi a única espécie que forrageou as flores estudadas. O comportamento de pouso, para utilização dos recursos florais, no complexo alas-quilha, possibilitou a exposição do estilete e a deposição dos grãos de pólen nas pernas e região ventral de *X. frontalis*, sendo considerado um polinizador eficaz.

**CAPÍTULO II. EFICÁCIA DE *Xylocopa frontalis* (OLIVIER, 1789) E EFEITOS DOS COMPONENTES DE FECUNDIDADE EM FLORES DE *Crotalaria juncea* L. (LEGUMINOSAE, PAPILIONOIDEAE)**

**RESUMO**

A eficácia do polinizador compreende a capacidade em transferir os grãos de pólen das anteras ao estigma receptivo da flor, resultando na formação de frutos e produção de sementes. Os objetivos desse capítulo foram: (1) comparar a eficácia de *Xylocopa frontalis*, de acordo com o número de visitas, na produção de frutos e sementes em *C. juncea* e, (2) investigar se o desenvolvimento das sementes está relacionado com a proximidade do recurso materno. Os seguintes tratamentos foram realizados: (1) autopolinização espontânea (n=30); (2) uma visita (n=30); (3) duas visitas (n=30); (4) três visitas (n=30). Flores ensacadas no estágio de botão foram expostas ao polinizador para testar a eficácia do visitante floral no sucesso reprodutivo da cultura agrícola. Registrou-se a massa dos frutos que se desenvolveram em cada tratamento, o número e a posição no fruto das sementes abortadas. Para avaliar os componentes de fecundidade foi estimado o número de flores em 30 indivíduos, o número de frutos formados e a formação de frutos em relação à posição na inflorescência em 300 inflorescências. O número de sementes/frutos e a posição de maior número de abortos de sementes foram registrados em 684 frutos. Nas flores ensacadas para o teste de autopolinização espontânea não houve formação de frutos. Houve diferença significativa no número e na massa dos frutos formados, apenas entre os tratamentos de 1 e 3 visitas ( $p < 0,05$ ). Houve diferença significativa no número de sementes abortadas, entre os três tratamentos. Houve diferença na posição das sementes abortadas dentro dos frutos formados, entre basal e mediana, e entre basal e apical. Quanto aos componentes de fecundidade, o número de sementes desenvolvidas e abortadas foi significativamente diferente entre as posições do fruto. Houve diferença significativa quando comparamos a distribuição das sementes abortadas e desenvolvidas entre as posições do fruto. Na região basal do fruto houve maior número de sementes abortadas. Na região apical do fruto houve maior desenvolvimento das sementes. Conclui-se que um maior número de visitas dos polinizadores pode aumentar a produtividade da cultura de *C. juncea*, resultando no aumento do número e massa dos frutos. Outra conclusão é que os recursos maternos são necessários ao desenvolvimento do fruto, porém para a semente é mais vantajoso estar próximo ao estigma.

**Palavras-chave:** aborto de sementes, adubo verde, frutificação, inflorescências, massa dos frutos.

**CHAPTER II. EFFICACY OF *Xylocopa frontalis* (OLIVIER, 1789) AND EFFECTS OF FERTILITY COMPONENTS IN *Crotalaria juncea* L. FLOWERS (LEGUMINOSAE, PAPILIONOIDEAE)**

**ABSTRACT**

The pollinator efficacy comprises the ability to transfer the pollen grains from the anthers to the flower receptive stigma, resulting in fruit and seed set. The aim of this chapter were: (1) to compare the efficacy of *Xylocopa frontalis*, according to the number of visits, on fruit and seed set in *C. juncea* and, (2) to investigate whether seed set is related to proximity of maternal resource. The following treatments were performed: (1) spontaneous self-pollination (n=30); (2) one visit (n=30); (3) two visits (n=30); (4) three visits (n=30). Bagged flowers at the bud stage were exposed to the pollinator to test the floral visitor efficacy in reproductive success of the agriculture crop. The fruits weight that were developed in each treatment was recorded and the number of aborted fruits and aborted seeds was verified. In 300 inflorescences were evaluated the fecundity components and was recorded the number of flowers in 30 individuals, the number of fruit set and the fruit set in relation to the inflorescence position. The number of seeds per fruits and the abortion seeds position were recorded in 684 fruits. In the bagged flowers for the spontaneous self-pollination test there was no fruit set. There was a significant difference in the number and developed fruits weight, only between treatments of 1 and 3 visits ( $p < 0,05$ ). There was a significant difference in the number of aborted seeds among the three treatments. There was a significant difference in the position of the aborted seeds inside the fruit set, between basal and median, and between basal and apical. Regarding the fertility components, the number of developed seeds and aborted seeds was significantly different between the fruit set positions. There was a significant difference when comparing the distribution of the aborted and developed seeds between the fruit set positions. In the basal position of the fruit set there were more aborted seeds. In the apical position of the fruit set there was more seed set. It is concluded that a higher number of pollinator visits can increase the productivity of the *C. juncea* crop, resulting in an increase in the number and fruit set weight. Another conclusion is that maternal resources are necessary for the fruit set, but for the seed set it is more advantageous to be near to the stigma.

**Key-words:** seed abortion, green manure, fruit set, inflorescences, fruit set weight.

## 1. INTRODUÇÃO

As interações planta-polinizador podem variar de acordo com os sistemas de polinização. Existem sistemas especializados (apenas um sistema de polinização em determinada espécie de planta), mistos (dois sistemas de polinização em uma única espécie de planta) ou generalistas (vários sistemas de polinização em uma única espécie de planta) (Waser et al., 1996; Brunet; Holmquist, 2009; Sahli; Conner, 2011; Rech; Bergamo; Figueiredo, 2014), envolvendo desde visitantes florais pouco especializados até os dependentes das flores para sua sobrevivência, como abelhas e algumas espécies de aves e morcegos (Obermuller et al., 2008).

A eficácia do polinizador compreende a sua capacidade em transferir os grãos de pólen das anteras ao estigma receptivo da flor, resultando na formação de frutos e sementes, ou seja, determina a contribuição que cada polinizador fornece ao sucesso reprodutivo da planta, levando em conta a estratégia de forrageio do polinizador, assim como o consumo de recursos e o desperdício do pólen (Freitas, 2013). Para ser classificado como polinizador eficaz de determinada espécie floral, é necessário que o visitante demonstre: (1) capacidade de atração pelas flores da espécie, (2) possua tamanho e comportamento adequados para a transferência dos grãos de pólen das anteras ao estigma, (3) transporte grande quantidade de pólen viável e compatível ao estigma, (4) visitação às flores quando os estigmas estão receptivos e antes da degradação dos óvulos (Free, 1993; Freitas; Paxton, 1996).

As abelhas são os polinizadores mais frequentes em Angiospermae, pois dependem das flores para a obtenção de alimento (Pirani; Cortopassi-Laurino, 1993; Pinheiro et al., 2014). Utilizam vários recursos das flores, como o néctar para a demanda energética e o pólen para a demanda proteica, resina para a construção do ninho, fragrâncias como atrativos para cópula e ceras para alimentação das larvas e reconstrução de colmeias (Roubik, 1989; Agostini et al., 2014). Em contrapartida, as plantas, ao receberem os visitantes, podem ter o pólen depositado nos estigmas das flores, dessa forma, contribuindo ao processo de fecundação do óvulo, formação de frutos e produção de sementes (Faegri; van der Pijl, 1980).

Nas espécies de Angiospermae, mesmo com o sucesso da fecundação dos óvulos, a probabilidade de que ocorra o aborto de frutos e sementes antes da maturação pode ser determinado, em parte, pela quantidade de grãos de pólen viáveis depositados no estigma (Lee, 1988; Rigney et al., 1993; Cunningham, 1996), isto é, os grãos de pólen podem apresentar baixa variabilidade genética e menor aptidão para fecundação das oosferas,

reduzindo a probabilidade do sucesso reprodutivo. Entretanto, a produção de frutos e sementes está comumente limitada pela disponibilidade de carboidratos e recursos minerais (Rigney, 1995). A alocação de recursos para o desenvolvimento de frutos e sementes é afetada pelo tempo de iniciação (Guitian, 1994; Emms, 1996) e a sua posição na planta (Lee; Bazzaz, 1986; Matthies, 1990; Guitian, 1994). No início da abertura floral e/ou flores proximalmente localizadas têm maior frutificação, produção de sementes e massa de sementes do que aquelas no final de abertura e/ou flores distais, no entanto mesmo dentro de uma inflorescência, distinguir entre vantagens espaciais e temporais relativas é extremamente difícil, já que ambos são altamente relacionados (Stöcklin; Favre, 1994).

O desenvolvimento de frutos e sementes são processos reprodutivos que competem por suas respectivas partilhas de recursos (Lee; Bazzaz, 1982; Lee, 1988). Poucos estudos avaliaram os efeitos da limitação de recursos sobre os padrões de desenvolvimento de frutos e sementes (Lee; Bazzaz, 1986; Solomon, 1988; Diggle, 1995). Esses padrões podem ter consequências profundas para frutos, predação e dispersão de sementes, sendo que todos têm implicações funcionais para a persistência e propagação de espécies ameaçadas e invasivas. No entanto, a caracterização detalhada de tais padrões é muito mais consumidora de tempo, por ser necessária a marcação da posição de cada um dos frutos ou sementes de uma planta, em vez de simplesmente contabilizá-los.

Sabendo que há poucos estudos referentes à biologia da polinização e reprodutiva, em espécies utilizadas em áreas agrícolas, com a finalidade de adubação verde, os objetivos deste capítulo foram: 1) comparar a eficácia de *Xylocopa frontalis*, de acordo com o número de visitas, na produção de frutos e sementes em *Crotalaria juncea* e, 2) investigar se o desenvolvimento das sementes, nos frutos, está relacionado com a proximidade do óvulo ao recurso materno. Sendo assim, as seguintes questões foram consideradas: (1) Há diferença no número de frutos formados entre os tratamentos realizados (autopolinização espontânea, uma visita, duas visitas ou três visitas)? (2) Há diferença na massa dos frutos entre os tratamentos de eficácia? (3) Há diferença no número de sementes abortadas entre os tratamentos de eficácia? (4) Em qual posição da inflorescência há maior formação de frutos? (5) Em qual posição do fruto há maior aborto de sementes? (6) E maior desenvolvimento de sementes? Espera-se que, quanto maior o número de visitas em flores de *C. juncea*, maior seja a quantidade de grãos de pólen transportados ao estigma, portanto maior número de tubos polínicos, resultando na fecundação das oosferas e proporcionando maior número e massa dos frutos. Com relação aos componentes de fecundidade de *C. juncea* é esperado que as posições basais das inflorescências apresentem maior formação de frutos, pois pode-se potencializar o

uso de recursos da planta-mãe para a formação de progênies aptas ao desenvolvimento (Lloyd, 1980). Quanto ao aborto das sementes, deve ocorrer nas posições do ovário mais distantes do estigma, pois esta é a situação mais comum para Leguminosae (Bawa; Buckley, 1989). Neste caso, óvulos basais seriam fertilizados pelos tubos polínicos com crescimento mais lento ou com menor capacidade competitiva e, portanto, mais propensos a serem abortados (Martin; Lee, 1993; Gibbs; Sasaki, 1998).

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 A espécie *Crotalaria juncea* L.**

Originária da Índia, a *C. juncea* é uma leguminosa de hábito arbustivo ereto, que pode atingir uma altura média de três metros (Graner et al., 1973). As flores são amarelas (Figura 1, capítulo I), pentâmeras e bissexuais, distribuídas em inflorescências que podem conter de 4 a 20 flores (RICCI, N.A.P., obs. pess., 2016). Oferece como recursos o néctar e o pólen, tendo como polinizadores principais as abelhas de grande porte (mamangavas) (Silva et al., 2009). Possui baixo índice de autocompatibilidade (Graner et al., 1973), com floração máxima no período de 120 dias após o plantio (Salgado et al., 1987). A melhor época de plantio é entre os meses de outubro a novembro, podendo ser realizada até março (Araújo, 2008).

### **2.2 Local de estudo**

O estudo foi desenvolvido em um plantio de *C. juncea*, na área urbana do município de Santa Bárbara d'Oeste (22°44'21.9"S; 47°21'22.6"W). O experimento foi instalado em uma área de aproximadamente 5.000m<sup>2</sup>, com 120 indivíduos (Figura 2, capítulo I), divididos em dois canteiros de dimensões 3m x 2m, com espaçamento das sementes de 0,3m x 0,3m e três sementes em cada ponto. O plantio foi realizado em dezembro de 2015, e a frutificação e formação das sementes ocorreu na segunda semana de março de 2016.

Nas áreas localizadas ao lado da plantação de *C. juncea*, havia: uma área com plantação de quiabo de 35m<sup>2</sup> (Figura 2, capítulo I), além de várias espécies como flamboyant-vermelho, urucum, ipê-de-jardim, resedá, maracujá-azedo, mangueira e plantação de milho.

Ao redor das áreas de plantio, a vegetação é composta por gramíneas. A área verde pertence à Prefeitura Municipal de Santa Bárbara d'Oeste, e todas as espécies plantadas no local foram realizadas pelos moradores. O local de estudo não apresenta remanescentes florestais nas áreas próximas ao cultivo. A classificação do clima é Cfa (clima temperado úmido com verão quente), segundo Köppen. A altitude do local do plantio de *C. juncea* foi de 626m. De acordo com a climatologia de precipitação do INPE, entre janeiro e março de 2016, a pluviosidade no município foi de 300 a 400mm. Vale ressaltar que os meses mais quentes, durante as etapas realizadas em campo, foram janeiro e fevereiro de 2016, com temperatura média de 25°C (CEPAGRI, 2016).

### **2.3 Eficácia de visitas de *Xylocopa frontalis* em flores de *Crotalaria juncea***

Para testar a autopolinização espontânea das flores de *C. juncea*, foram plantadas 60 sementes, distribuídas em 20 sacos plásticos com orifícios para escoar a água, contendo terra orgânica (três sementes por saco), e vale ressaltar que todas as sementes possuíam as mesmas dimensões. Esses foram armazenados dentro de uma estufa fechada, localizada no Viveiro Municipal de Santa Bárbara d'Oeste (22°43'49.6''S; 47°24'18.5''W), de forma a impedir o acesso de visitantes florais durante a floração da espécie. Durante a floração foram realizadas duas visitas semanais à estufa para verificar se havia formação de frutos, sendo que esse acompanhamento ocorreu até a senescência de todas as flores.

Ao longo dos testes controlados de eficácia dos visitantes florais, em campo, observou-se que o único polinizador das flores de *C. juncea* foi a abelha *X. frontalis*. Para determinar a influência do número de visitas dessa espécie, na formação de frutos e produção de sementes foram realizados quatro tratamentos: 1) autopolinização espontânea, 2) uma visita, 3) duas visitas e 4) três visitas. Em todos os tratamentos foram utilizados (n=30) botões florais de *C. juncea*.

Inflorescências com botões florais foram previamente ensacadas com tule (Figura 1A) e posteriormente expostas individualmente ao visitante após a abertura das flores (Figura 1B). Após as visitas dos polinizadores, nos testes de uma, duas ou três visitas, as flores foram novamente ensacadas, para garantir que nenhum outro visitante floral comprometesse o experimento. Os frutos desenvolvidos (Figura 1C) foram coletados quando apresentaram coloração verde (aproximadamente 40 dias após o término dos testes de visitas) (Figura 2) e avaliados quanto ao número de sementes abortadas e massa fresca do fruto, assim, foi

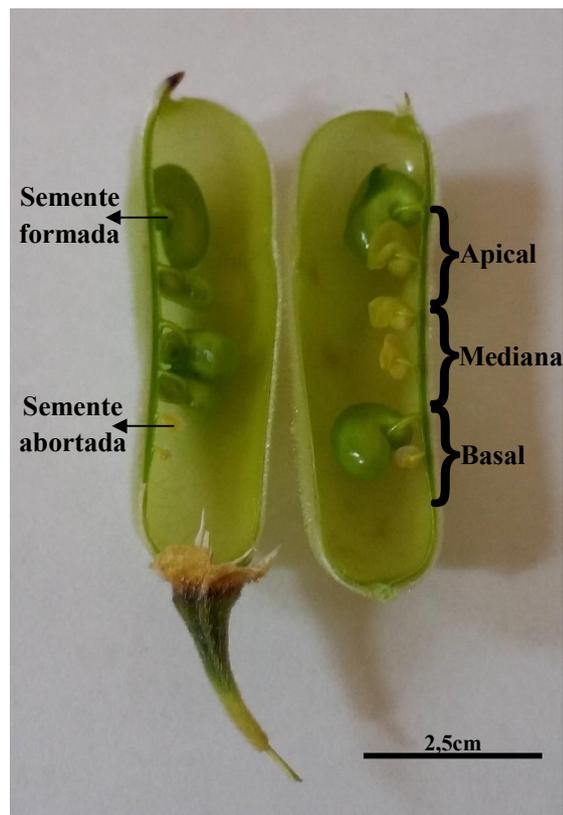
verificado se houve distinção entre os três tratamentos, tanto no aborto das sementes quanto nas massas dos frutos formados.

**Figura 1.** Inflorescência de *C. juncea* ensacada com tule para realização dos testes de eficácia do polinizador com relação ao número de visitas: (A) botões florais, (B) flores abertas e (C) fruto maduro.



Fonte: 1A-C. Própria autoria.

**Figura 2.** Corte longitudinal do fruto de *C. juncea*, com os indicativos das posições da vagem (basal, mediana e apical) e a formação e aborto das sementes.



Fonte: 2. Própria autoria.

Foi aplicado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk, em todos os dados analisados, posteriormente submetidos ao teste estatístico paramétrico (ANOVA) e não paramétrico (Kruskal-Wallis), seguidos pelos índices de Tukey e Dunnett, ao nível de significância de 5%, através do software R versão 3.1.1<sup>®</sup> (Gentleman et al., 2014). Também foi aplicado o teste G, nos dados do número de frutos formados nos testes de visitas de *X. frontalis*.

#### **2.4 Efeitos dos componentes de fecundidade em flores de *Crotalaria juncea***

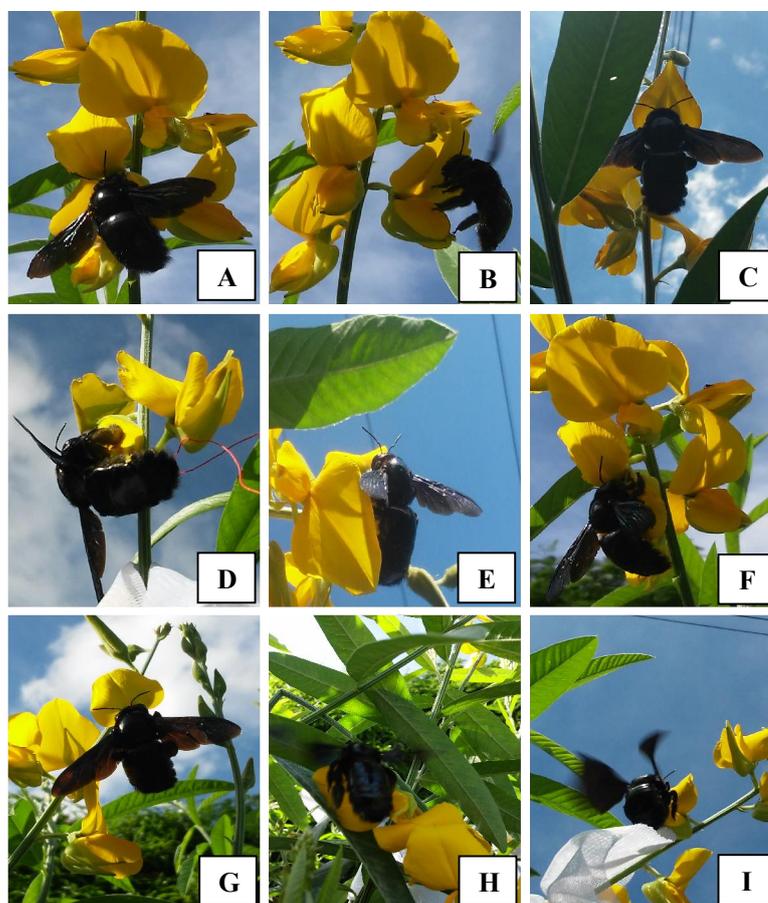
Para a avaliação dos componentes de fecundidade, foram contabilizadas a formação de frutos e o número de flores, em 30 indivíduos de *C. juncea*, que não haviam sido utilizados nos testes de eficácia ou nas observações descritas no capítulo I. A contagem do número de óvulos/ovário foi realizada em 10 flores e as diferenças na formação de frutos em relação à posição na inflorescência (apical, mediana ou basal) em 300 inflorescências. O número de sementes/frutos e a posição de maior número de aborto de sementes foram registrados em 684 frutos. Para a comparação do número de frutos formados, nas inflorescências, e o número de sementes desenvolvidas e abortadas, nos frutos, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis (H) e o índice de Dunnett, ao nível de significância de 5%, através do software R<sup>®</sup>.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Eficácia de visitas de *Xylocopa frontalis* em flores de *Crotalaria juncea*

Ao longo das semanas de observação do visitante floral, houve apenas visitas de fêmeas de abelhas *X. frontalis*. O comportamento de contato dessas abelhas com as estruturas reprodutivas abrigadas na quilha (abordagem da quilha) foi descrito no Capítulo I (Figuras 3A-I).

**Figuras 3A-I.** Fêmeas de *X. frontalis* forrageando as flores de *C. juncea*. As *X. frontalis* visitam as flores de *C. juncea*, em busca de néctar, e, ao pousarem na quilha, acionam o mecanismo de liberação dos grãos de pólen, que se aderem em sua região torácica e abdominal ventral e pernas anteriores e medianas.



Fonte: 3A-I. Própria autoria.

Nas flores ensacadas para a realização do teste de autopolinização espontânea (n=30), não houve formação de frutos. O mesmo resultado foi obtido nos 60 indivíduos da estufa, pois não tiveram contato com o polinizador.

Foi verificado o aumento na frutificação, conforme a adição do número de visitas nas flores. Com uma visita formaram-se 11 frutos (33,66%), com duas visitas, 19 (63,33%), e com três visitas, 25 (83,33%). O teste G mostrou que a diferença significativa ocorreu entre os tratamentos de uma e três visitas ( $G=12,2364$ ,  $p=0,0005$ ), e não houve diferença significativa entre os tratamentos de uma e duas visitas ( $G=3,297$ ,  $p=0,0694$ ) e entre duas e três visitas ( $G=2,1584$ ,  $p=0,1418$ ) (Quadro 1).

Foi verificado o aumento na média da massa dos frutos formados, conforme a adição do número de visitas. Com uma visita foi obtida uma média de 0,58g, com duas visitas, 0,63g, e com três visitas, 0,74g. O teste de Kruskal-Wallis mostrou que a diferença significativa ocorreu entre os tratamentos de uma e três visitas ( $p=0,0001146$ ), e não houve diferença significativa entre os tratamentos de uma e duas visitas ( $p=0,1127083$ ) e entre duas e três visitas ( $p=0,1340360$ ) (Quadro 2).

Foi verificado o aumento no número total de sementes desenvolvidas nos frutos, conforme a adição do número de visitas. Com uma visita formaram-se 87 sementes, com duas visitas, 167, e com três visitas, 229. O teste de Kruskal-Wallis mostrou que a diferença significativa ocorreu entre os tratamentos de uma e duas visitas ( $p=0,0375180$ ) e uma e três visitas ( $p=0,0000775$ ). Não houve diferença significativa entre os tratamentos de duas e três visitas ( $p=0,1340360$ ) (Quadro 3).

**Quadro 1.** Número de frutos formados, nos três tratamentos de visitas de *X. frontalis* às flores de *C. juncea*, assim como os valores do teste G e valores de  $p$ , utilizados na comparação dos diferentes tratamentos.

Tratamentos	Nº de frutos formados	Tratamentos comparados	Teste G	Valor de $p$
1 visita	11/30 (36,66%)	Entre 1 e 2 visitas	3,297	0,0694
2 visitas	19/30 (63,33%)	Entre 1 e 3 visitas	12,2364	0,0005*
3 visitas	25/30 (83,33%)	Entre 2 e 3 visitas	2,1584	0,1418

\* Diferença significativa a 5%.

**Quadro 2.** Massa média ( $\pm$  desvio-padrão) dos frutos formados, nos três tratamentos de visitas de *X. frontalis* às flores de *C. juncea*, assim como os valores de  $p$ , por meio do teste de Kruskal-Wallis (H) e índice de Dunnett.

Tratamentos	Nº de frutos formados	Média da massa dos frutos formados (g) $\pm$ desvio-padrão	Tratamentos comparados	Valor de $p$
1 visita	11	0,58 $\pm$ 0,37	Entre 1 e 2 visitas	0,1127083
2 visitas	19	0,63 $\pm$ 0,36	Entre 1 e 3 visitas	0,0001146*
3 visitas	25	0,74 $\pm$ 0,34	Entre 2 e 3 visitas	0,0593677

\* Diferença significativa a 5%.

**Quadro 3.** Número de sementes desenvolvidas, nos três tratamentos de visitas de *X. frontalis* às flores de *C. juncea*, assim como os valores de  $p$ , por meio do teste de Kruskal-Wallis e índice de Dunnett.

Tratamentos	Nº de frutos formados	Sementes desenvolvidas/fruto (nº total)	Tratamentos comparados	Valor de $p$
1 visita	11	87	Entre 1 e 2 visitas	0,0375180*
2 visitas	19	167	Entre 1 e 3 visitas	0,0000775*
3 visitas	25	229	Entre 2 e 3 visitas	0,1340360

\* Diferença significativa a 5%.

Salienta-se que na posição basal do fruto houve maior quantidade de sementes abortadas (n=93), seguida pela mediana (n=58) e apical (n=53). Com a aplicação da ANOVA não foi observada diferença significativa entre as diferentes posições nos três tratamentos utilizados em campo ( $F_{[2,6]}=2,558, p=0,157$ ) (Quadro 4).

**Quadro 4.** Número total de abortos das sementes de *C. juncea*, nos testes de eficácia de *X. frontalis*, de acordo com a posição no fruto (basal, mediana e apical).

Visitas	Posições			Total
	Basal	Mediana	Apical	
1	26	13	12	51a
2	29	14	25	68a
3	38	31	16	85a
Total	93	58	53	

Médias com letras iguais não diferem estatisticamente entre si a  $p < 0,05$ .

### 3.2 Efeitos dos componentes de fecundidade em flores de *Crotalaria juncea*

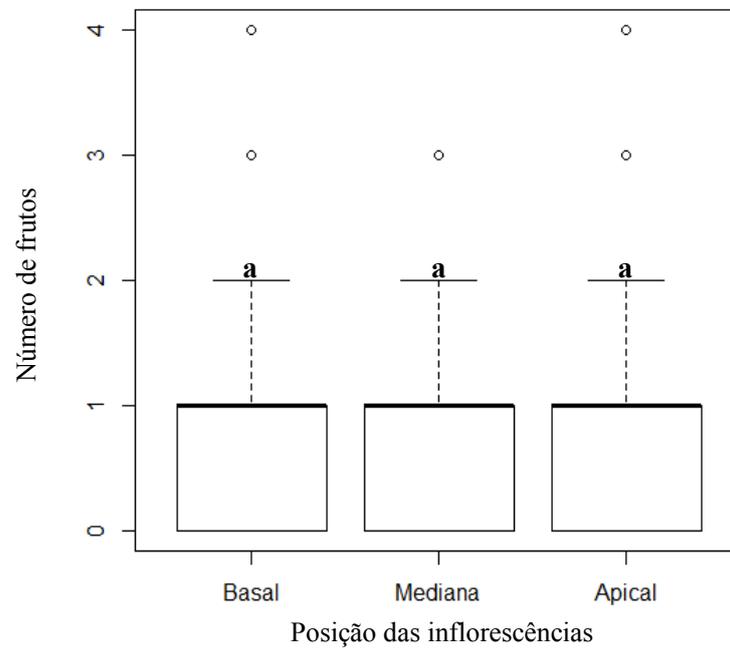
A avaliação dos componentes de fecundidade foi realizada em trinta indivíduos de *C. juncea* e foi quantificado um total de 2.940 flores e 684 frutos. Em relação à formação de frutos em *C. juncea* ( $n^\circ$  de frutos total /  $n^\circ$  de flores total) houve 23,3% de frutificação, nos indivíduos amostrados. Foi contabilizado o número de flores e frutos de *C. juncea* ( $n=30$  indivíduos,  $n=10$  inflorescências por indivíduo), e obteve-se um valor médio ( $\pm$  desvio padrão) de  $9,8(\pm 2,61)$  e  $2,28(\pm 1,15)$ , respectivamente. Foi obtido o valor médio do número de óvulos nos ovários em ( $n=10$ ) flores: de  $10,6(\pm 1,96)$ .

Dos frutos quantificados ( $n=684$ ), houve formação na posição basal ( $n=242$ ) (35,38%), na posição mediana ( $n=217$ ) (31,73%) e na posição apical ( $n=225$ ) (32,89%). Os valores para os frutos formados nas posições basal, mediana e apical das inflorescências de *C. juncea*, não seguiram uma distribuição normal ( $W=0,8011$ ,  $p<0,001$ ), ( $W=0,7879$ ,  $p<0,001$ ) e ( $W=0,7764$ ,  $p<0,001$ ), respectivamente. Não foi observada diferença significativa entre a formação de frutos nas três posições das inflorescências ( $H=0,9327$ ,  $df=2$ ,  $p=0,6273$ ) (Figura 4).

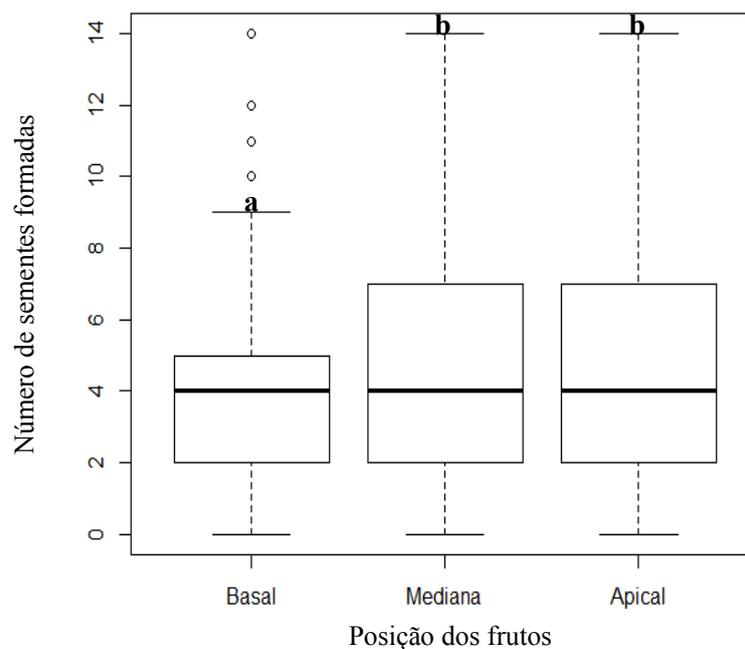
O número de sementes desenvolvidas foi de ( $n=1.227$  na posição basal,  $n=1.388$  sementes na posição mediana e  $n=1.461$  sementes na posição apical). Os valores para as sementes desenvolvidas nas posições basal, mediana e apical dos frutos de *C. juncea*, não seguiram distribuição normal ( $W=0,9169$ ,  $p=7,557^{-12}$ ), ( $W=0,9438$ ,  $p=2,781^{-9}$ ) e ( $W=0,9419$ ,  $p=1,74^{-9}$ ), respectivamente. Foi observada diferença significativa entre a formação de sementes nas três posições dos frutos ( $H=12,4708$ ,  $df=2$ ,  $p=0,001959$ ). Houve diferença entre as posições basal e mediana ( $p=0,0461684$ ) e basal e apical ( $p=0,0016510$ ). Comparando as posições mediana e apical não houve diferença ( $p=0,5275464$ ) (Figura 5).

O número de sementes abortadas foi de ( $n=1.395$  sementes na posição basal,  $n=1.217$  sementes na posição mediana e  $n=1.157$  sementes na posição apical). Os valores para as sementes abortadas nas posições basal, mediana e apical dos frutos de *C. juncea*, não seguiram distribuição normal ( $W=0,9106$ ,  $p=2,322^{-12}$ ), ( $W=0,8823$ ,  $p=1,978^{-14}$ ) e ( $W=0,9046$ ,  $p=7,778^{-13}$ ), respectivamente. Foi observada diferença significativa entre o aborto de sementes nas três posições dos frutos ( $H=12,9398$ ,  $df=2$ ,  $p=0,001549$ ). Houve diferença entre as posições basal e mediana ( $p=0,0459045$ ) e basal e apical ( $p=0,0042841$ ). Comparando as posições mediana e apical não houve diferença ( $p=0,7014498$ ) (Figura 6).

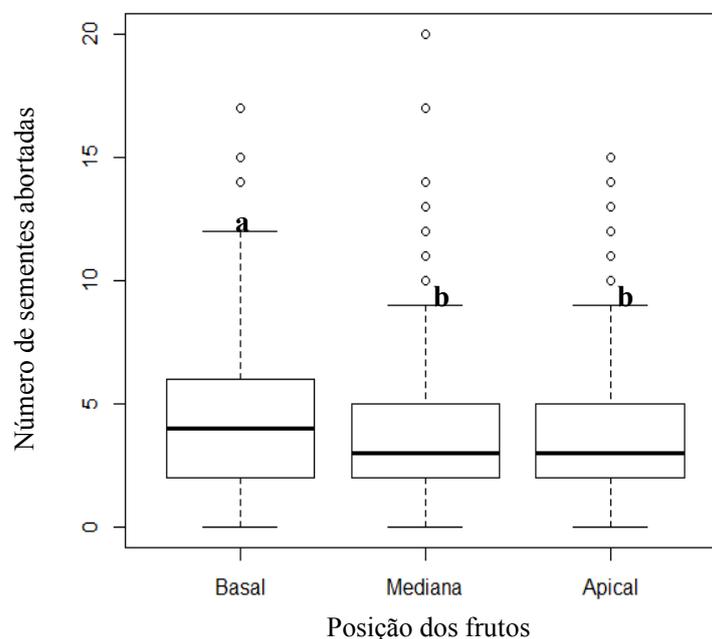
**Figura 4.** Box-plot do número de frutos formados, de acordo com a posição nas inflorescências de *C. juncea* (basal, mediana e apical). A mediana representa a linha horizontal dentro da caixa. Valores máximo e mínimo são representados por linhas horizontais curtas, círculos representam valores fora do limite interno da caixa. Médias com letras iguais não diferem estatisticamente entre si a  $p < 0,05$ .



**Figura 5.** Box-plot do número de sementes formadas, de acordo com a posição nos frutos de *C. juncea* (basal, mediana e apical). A mediana representa a linha horizontal dentro da caixa. Valores máximo e mínimo são representados por linhas horizontais curtas, círculos representam valores fora do limite interno da caixa. Médias com letras diferentes diferem estatisticamente entre si a  $p < 0,05$ .



**Figura 6.** Box-plot do número de sementes abortadas, de acordo com a posição nos frutos de *C. juncea* (basal, mediana e apical). A mediana representa a linha horizontal dentro da caixa. Valores máximo e mínimo são representados por linhas horizontais curtas, círculos representam valores fora do limite interno da caixa. Médias com letras diferentes diferem estatisticamente entre si a  $p < 0,05$ .



## 4. DISCUSSÃO

### 4.1 Eficácia de visitas de *Xylocopa frontalis* em flores de *Crotalaria juncea*

Em *C. juncea* não houve formação de frutos nos testes de autopolinização espontânea em campo e em estufa, indicando que apresenta algum nível de autoincompatibilidade, dado também mencionado por Maeda et al. (1986). O número de frutos formados diferiu entre os tratamentos de 1 e 3 visitas, o que corrobora a discussão de Lowenstein e Minor (2015), em que o maior número de visitas de abelhas pode resultar numa maior formação de frutos, no caso de testes controlados, em que há maior período de tempo entre uma visita e outra, permitindo que haja maior produção de grãos de pólen nas anteras e, assim, maior transferência polínica pelo vetor biótico.

Houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre a massa dos frutos formados, nos tratamentos de 1 e 3 visitas, sugerindo que a espécie *C. juncea* pode exigir pelo menos 2 visitas de *X. frontalis* para maior otimização na formação de frutos e produção de sementes. Propõe-se que uma única visita a uma flor de *C. juncea* seja capaz de produzir um fruto, mas, o maior número de visitas dos polinizadores pode aumentar o número de frutos produzidos e a

produtividade na cultura dessa espécie, assim como observado em culturas dependentes da polinização por insetos (Artz et al., 2011).

Os resultados com relação ao desenvolvimento e aborto das sementes, nos testes de eficácia, mostram que ocorre maior número de sementes desenvolvidas, conforme o número de visitas de *X. frontalis* aumenta e o maior aborto das sementes ocorre na posição basal dos frutos. Sobre isso, Bawa e Buckley (1989) e Susko e Lovett-Doust (1999), relatam que as sementes localizadas na posição basal do fruto são as competidoras mais fortes por recursos devido à proximidade dos recursos maternos. No entanto, há relatos de espécies da família Leguminosae em que se observa um aumento de embriões abortados conforme estes se distanciam do estigma, pois o maior número de visitas reflete na maior transferência polínica e se óvulos que estão mais próximos ao estigma forem fertilizados pelas células espermáticas dos grãos de pólen e formarem embriões antes dos demais óvulos, eles terão sucesso na obtenção de recursos em relação aos óvulos que estão mais distantes do estigma, os quais serão abortados devido à redução nutricional necessária ao desenvolvimento das sementes (Teixeira et al., 2006).

Outrossim, em *C. juncea* verificou-se o aumento na frutificação de 36,66% (uma visita) para 83,33% (três visitas), o aumento da massa média dos frutos de 0,58g (uma visita) para 0,74g (três visitas) e o aumento no número de sementes desenvolvidas de 87 (uma visita) para 229 (três visitas). A diferença significativa de uma para três visitas de *X. frontalis* sugere que os frutos de *C. juncea* podem crescer para um tamanho mais adequado, além de maior produção de sementes, podendo ser utilizados no plantio do adubo verde para fins de adubação verde ou na rotação de culturas, e atrair os visitantes florais, contribuindo à maior produtividade agrícola das culturas.

#### **4.2 Efeitos dos componentes de fecundidade em flores de *Crotalaria juncea***

A respeito do padrão de formação dos frutos, nas inflorescências de *C. juncea*, não houve diferença significativa entre as três posições das inflorescências, portanto é possível discutir que não houve competição por recursos para o desenvolvimento de frutos, de modo que o uso de recursos fisiológicos necessários à formação de progênie aptas (Lloyd, 1980), viabilizou a formação de frutos. Sobre os resultados do desenvolvimento e aborto das sementes, em várias famílias de Angiospermas as sementes desenvolvidas são formadas a partir de uma pequena proporção de óvulos, dos quais alguns podem não se desenvolver

devido à ausência de fertilização e, em outros, que são fertilizados, os embriões são abortados durante o desenvolvimento (embriogênese) (Sedgley, 1980; Bawa; Webb, 1984).

Nas flores de Leguminosae, a posição dos óvulos no ovário é um fator importante para a ordem de fertilização, pois alguns óvulos estão localizados mais próximos ao estigma do que à planta-mãe. Esses óvulos devem ser fertilizados por tubos polínicos que apresentam crescimento mais rápido e que supostamente possuem maior variabilidade genética (Bookman, 1984), e dessa forma, os abortos seletivos seriam direcionados para a região basal do fruto. Os abortos seletivos em plantas são bastante comuns, principalmente pela ocorrência de incompatibilidade genética entre o tecido do gineceu e os tubos polínicos e a polinização com grãos de pólen de baixa aptidão (Mayhew, 2006), aumentando a probabilidade de aborto embrionário. Outro ponto que pode influenciar é a limitação de pólen depositado no estigma, que pode restringir o número de óvulos que se desenvolvem em sementes, reduzindo o sucesso da fertilização, porém mesmo após a fertilização o aborto dos embriões pode reduzir substancialmente o número de sementes desenvolvidas (Korbecka et al., 2002).

## **5. CONCLUSÃO**

É possível concluir que um maior número de visitas dos polinizadores pode aumentar a produtividade da cultura de *C. juncea*, resultando em maior número de frutos formados, acréscimo na massa dos frutos e no desenvolvimento das sementes, corroborando a hipótese inicial. Outra conclusão importante é que os recursos maternos são necessários para desenvolvimento do fruto, porém com relação ao desenvolvimento da semente nota-se que a proximidade com o estigma e, conseqüentemente, o contato com os primeiros tubos polínicos é mais vantajoso do que estar próximo da base do ovário, onde há maior contato com o recurso materno.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Podemos concluir que a atuação de *X. frontalis*, no plantio de *C. juncea*, pode estar relacionada à presença de outras espécies que floresceram no mesmo período. As espécies de plantas adjacentes forneceram locais para nidificação e fontes de recursos florais para a manutenção e atração desses visitantes na área do cultivo. O fato de se tratar de uma área em que não são utilizados insumos químicos é outro aspecto relevante a ser considerado para a manutenção dos visitantes florais observados. O polinizador observado para a espécie estudada foi a abelha com alta massa corpórea, pertencente ao gênero *Xylocopa*. A identificação do visitante floral, o horário de maior visita às flores, assim como a observação e descrição do comportamento em que se dão suas atividades de forrageio são de extrema importância a fim de se promover o manejo adequado das mesmas nas áreas de cultivo.

Pode-se observar que a morfologia floral de *C. juncea* influenciou no comportamento de forrageio de *X. frontalis*, contribuindo à transferência polínica ao estigma, ao maior número de frutos formados a cada visita, acréscimo na média da massa dos frutos e maior desenvolvimento de sementes, fatores esses que podem ressaltar a importância dessa espécie de abelha na polinização das flores de *C. juncea* e, em áreas agrícolas, refletir na produtividade da cultura. Portanto, sugere-se que em estudos de visitantes florais e polinização, é necessário conferir a morfologia floral, o comportamento dos visitantes nas flores, realizar testes comparativos para verificar quais são os polinizadores mais eficazes em determinada espécie de planta e constatar possíveis problemas reprodutivos vinculados à disponibilidade de recursos provenientes da planta-mãe e à quantidade de grãos de pólen depositados no estigma da flor, que podem levar ao aborto embrionário e à redução na formação de frutos e sementes. É importante destacar o entendimento da relação abelha-flor, assim como as implicações dentro dos ecossistemas. Para isso, propõe-se o levantamento das espécies de abelhas que ocorrem em determinada área, os aspectos fenológicos, comportamentais, adaptações morfológicas das abelhas e das flores e interações comportamentais, espaciais e temporais entre diferentes espécies de abelhas que buscam os mesmos recursos.

A compreensão da importância das abelhas na produtividade agrícola do adubo verde *C. juncea* aponta para duas grandes decisões: (1) manter a vegetação nativa, em especial as formações florestais devido à diversidade de fauna e flora, e (2) utilizar o conhecimento da importância do serviço ambiental prestado pelas abelhas, como forma de extensão às áreas agrícolas, destacando a influência do plantio de espécies de adubo verde no entorno de

determinada cultura agrícola, mantendo os polinizadores na área durante a floração, contribuindo ao (a) processo de polinização; (b) maior frutificação; (c) acréscimo na massa dos frutos formados, um item importante em culturas em que o aumento na massa do fruto influencia no lucro do produtor; (d) frutos maiores e com menos imperfeições; (e) maior formação de sementes/fruto. O conhecimento dos benefícios gerados pelo serviço de polinização, bem como a sua divulgação, são fatores relevantes na mudança do pensamento ecológico e ambiental.

## REFERÊNCIAS

AGOSTINI, K. Ecologia da reprodução de duas espécies de *Mucuna* (Leguminosae, Faboideae, Phaseoleae): embriologia, citogenética e variabilidade genética-do litoral norte de São Paulo. **Tese de Doutorado**. Universidade Estadual de Campinas, 170 p., 2008.

AGOSTINI, K.; LOPES, A. V.; MACHADO, I. C. S. Capítulo 6: Recursos florais. In: RECH, A. R.; AGOSTINI, K.; OLIVEIRA, P. E.; MACHADO, I. C. (Org.). **Biologia da Polinização**. Rio de Janeiro: Editora Projeto Cultural, 2014, p. 129-150.

ALLEN-WARDWELL, G.; BERNHARDT, P.; BITNER, R. The potential consequences of pollinator declines on the conservation of biodiversity and stability of food crop yields. **Conservation Biology**, v. 12, p. 8-17, 1998.

ALMEIDA, N. M.; CASTRO, C. C.; LEITE, A. V. L.; 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, 2013.

ALMEIDA, N. M.; COTARELLI, V. M.; SOUZA, D. P.; NOVO, R. R.; FILHO, J. A. S.; OLIVEIRA, P. E.; CASTRO, C. C. Enantiostylous types of Cassiinae species (Fabaceae-Caesalpinioideae). **Plant Biology**, v. 17, p. 740–745, 2015.

AMARAL-NETO, L. P. **Forma e funcionamento das flores com quilha invertida em Faboideae e interações comportamentais com abelhas visitantes**. Curitiba: UFPR, 2011, 166 p.

ARAÚJO, W. B. M. **Fertilização orgânica no desenvolvimento da leguminosa *Crotalaria juncea* L.** Mossoró, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Dissertação de Mestrado, 2008.

ARIAS-SUÁREZ, J. C.; OCAMPO-PÉREZ, J. A.; URREA-GÓMEZ, R. La polinización natural en el maracuyá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) como un servicio reproductivo y ecosistémico. **Agronomía mesoamericana**, v. 25, n. 1, p. 73–83, 2014.

ARROYO, M. T. K. Breeding systems and pollination biology in Leguminosae. In: POLHILL, R. M.; RAVEN, P. H. (Eds.). **Advances in Legume Systematics**, v. 2, 1981, p. 723–769.

ARTZ, D. R.; HSU, C. L.; NAULT, B. A. Performance of *Apis mellifera*, *Bombus impatiens*, and *Peponapis pruinosa* (Hymenoptera: Apidae) as pollinators of pumpkin. **Journal of Economic Entomology**, v. 104, p. 1153–1161, 2011.

BARRETT, S. C. Darwin's legacy: the forms, function and sexual Diversity of flowers. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 365, p. 351–368, 2010.

BARROSO, G. M. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Viçosa: Imprensa Universitária, v. 2, 1991.

BAWA, K. S.; WEBB, C. J. Flower, fruit, and seed abortion in tropical forest trees: implication for the evolution of paternal and maternal reproductive patterns. **American Journal of Botany**, v. 71, p. 736–751, 1984.

BAWA, K. S.; BUCKLEY, D. P. Seed: ovules ratios, selective seed abortion and mating systems in Leguminosae. **Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden**, v. 29, p. 243-262, 1989.

BENEVIDES, C. R.; GAGLIANONE, M. C.; HOFFMANN, M. Visitantes florais do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg. Passifloraceae) em áreas de cultivo com diferentes proximidades a fragmentos florestais na região Norte Fluminense, RJ. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 53, n. 3, p. 415–421, 2009.

BOATWRIGHT, J. S.; TILNEY, P. M.; VAN WYK, B. E. A taxonomic revision of the genus *Rothia* (Crotalariaeae, Fabaceae). **Australian Systematic Botany**, v. 21, p. 422–430, 2008a.

BOATWRIGHT, J.S.; LE ROUX, M. M.; WINK, M.; MOROZOVA, T.; VAN WYK, B. E. Phylogenetic relationships of the tribe Crotalariaeae (Fabaceae) inferred from DNA sequences and morphology. **Systematic Botany**, v. 33, p. 752–761, 2008b.

BOATWRIGHT, J. S.; VAN WYK, B. E. A revision of the African genus *Robynsiophyton* (Crotalariaeae, Fabaceae). **South African Journal of Botany**, v. 75, p. 367–370, 2009.

BOATWRIGHT, J. S.; WINK, M.; VAN WYK, B. E. The generic concept of *Lotononis* (Crotalariaeae, Fabaceae): reinstatement of the genera *Euchlora*, *Leobordea* and *Listia* and the new genus *Ezoloba*. **Taxon**, v. 60, p. 161–177, 2011.

BOOKMAN, S. S. Evidence for selective fruit production in *Asclepias*. **Evolution**, p. 72-86, 1984.

BRUNET, J.; HOLMQUIST, G. A. The influence of distinct pollinators on female and male reproductive success in the Rocky Mountain columbine. **Molecular Ecology**, v. 18, p. 3745-3758, 2009.

BUCHMANN, S. L. Buzz pollination in angiosperms. In: JONES, C. E.; LITTLE, R. J. (Eds.). **Handbook of experimental pollination biology**, Van Nostrand Reinhold, New York, 1983, p. 73-113.

CAMILLO, E. **Polinização do Maracujá**. 1st ed., Ribeirão Preto: Holos, 2003, 44 p. CEPAGRI. **Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas à Agricultura**. Campinas: Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Disponível em: <<http://www.webcitation.org/6NdgbJbGN>>. Acesso em: 20 jun. 2016.

COELHO, A. P. D.; MORAIS, K. P.; LAUGHINGHOUSE, H. D.; GIACOMINI, S. J.; TEDESCO, S. B. Pollen grain viability in accessions of *Crotalaria juncea* L.(Fabaceae). **Agrociencia (Montecillo)**, v. 46, n. 5, p. 481-487, 2012.

CRISP, M. D.; GILMORE, S.; VAN WYK, B. E. Molecular phylogenetics of the genistoid tribes of papilionoid legumes. In: HERENDEEN, P. S., BRUNEAU, A. (Eds.). **Advances in Legume Systematics**, v. 9, 2000, p. 249–276.

CULLEY, T. M.; WELLER, S. G.; SAKAI, A. K. The evolution of wind pollination in angiosperms. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 17, p. 361-369, 2002.

CUNNINGHAM, S. A. Pollen supply limits fruit initiation by a rain forest understorey palm. **Journal of Ecology**, v. 84, p. 185-194, 1996.

DEDEJ, S.; DELAPLANE, K. S. Nectar-robbing carpenter bees reduce seedsetting capability of honey bees (Hymenoptera: Apidae) in rabbiteye blueberry, *Vaccinium ashei*, 'climax'. **Environmental Entomology**, v. 33, n. 1, p. 100-106, 2004.

DEEPIKA, S. D.; SOWMYA, L. K.; RATNA, K. P. K. *Crotalaria laburnifolia* pollen - biochemical analysis. **European Journal of Pharmaceutical and Medical Research**, v. 2, n. 7, p. 227-229, 2015.

DE LUCA, P. A.; VALLEJO-MARÍN, M. What's the "buzz" about? The ecology and evolutionary significance of buzz-pollination. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 16, p. 429-435, 2013.

DELPINO, F. Ulteriori osservazioni e considerazioni sulla dicogamia nel regno vegetale I. J. **Atti della Società Italiana di Scienze Naturali Milano**, v. 11, p. 265-332, 1868/1869.

DIGGLE, P. K. Architectural effects and the interpretation of patterns of fruit and seed development. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 26, p. 531-552, 1995.

EMMS, S. K. Temporal patterns of seed set and decelerating fitness returns on female allocation in *Zigadenus paniculatus* (Liliaceae), an andromonoecious lily. **American Journal of Botany**, v. 83, p. 304-315, 1996.

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

ETCHEVERRY, A. V. Dynamic dispensing of pollen: an empirical study. Proc. 8th Internat. Pollination Sympos. **Acta Horticulturae**, n. 561, p. 67-70, 2001a.

ETCHEVERRY, A.V. Floral biology and pollination in *Crotalaria stipularia* (Fabaceae: Papilionoideae). Proc. 8th Internat. Pollination Sympos. **Acta Horticulturae**, n. 561, p. 339-342, 2001b.

FAEGRI, K.; VAN DER PIJL, L. **The principles of pollination ecology**. 3. ed. Oxford: Pergamon Press, 1979. 244 p.

FAEGRI, K.; VAN DER PIJL, L. **The principle of pollination ecology**. 3 ed. rev. New York: Pergamon Press, 1980. 244 p.

FAHN, A. **Plant Anatomy**. 4th ed. Oxford, Pergamon Press, 1990.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Principios y avances sobre polinización como servicio ambiental para la agricultura sostenible en países de Latinoamérica y el Caribe**. 1a ed ed. Santiago, Chile: 2014.

FARIA, C. M. B.; SOARES, J. M. M.; LEÃO, P. C. S. Adubação verde com leguminosas em videira no Submédio São Francisco. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 28, p. 641-648, 2004.

FAVERO, C.; JUCKSCH, I.; COSTA, L. M.; ALVARENGA, R. C.; NEVES, J. C. L. Crescimento e acúmulo de nutrientes por plantas espontâneas e por leguminosas utilizadas para adubação verde. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 24, p. 171-177, 2000.

FENSTER, C. B.; ARMBRUSTER, W. S.; WILSON, P.; DUDASH, M. R.; THOMSON, J. D. Pollination syndromes and floral specialization. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v. 35, p. 375-403, 2004.

FILARDI, F. L. R.; GARCIA, F. C. P.; DUTRA, V. F.; SÃO-THIAGO, P. S. Papilionoideae (Leguminosae) do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. **Hoehnea**, v. 34, p. 383-408, 2007.

FORMENTINI, E. A. **Cartilha sobre adubação verde e compostagem**. Vitória, ES: Instituto Capixaba de Assistência Técnica, Pesquisa e Extensão Rural, 2008. 27 p. Disponível em: <[http://agroecologia.incaper.es.gov.br/site/images/publicacoes/cartilha\\_leguminosas.pdf](http://agroecologia.incaper.es.gov.br/site/images/publicacoes/cartilha_leguminosas.pdf)>. Acesso em: 15 abr. 2016.

FREE, J. B. **Insect pollination of crops**. 2. ed. Londres: Academic Press, 1993, 684 p.

FREITAS, B. M.; PAXTON, R. J. The role of wind and insects in cashew (*Anacardium occidentale*) pollination in NE Brazil. **Journal of Agricultural Science**, v. 126, p. 319-326, 1996.

FREITAS, B. M.; NUNES-SILVA, P. Polinização agrícola e sua importância no Brasil. In: IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. et al. **Polinizadores no Brasil**. Edusp: São Paulo, 2012, p. 103-118.

FREITAS, L. Concepts of pollinator performance: is a simple approach necessary to achieve a standardized terminology? **Brazilian Journal of Botany**, v. 36, n. 1, 2013.

FREITAS, B. M.; SILVA, C.I. O papel dos polinizadores na produção agrícola no Brasil. In: IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. (Org.). **Agricultura e Polinizadores**. 1. ed. São Paulo: A.B.E.L.H.A., v. 1, p. 9-18, 2016.

GARIBALDI, L. A.; STEFFAN-DEWENTER, I.; WINFREE, R.; AIZEN, M. A.; BOMMARCO, R.; CUNNINGHAM, S. A.; BARTOMEUS, I. Wild pollinators enhance fruit set of crops regardless of honey bee abundance. **Science**, v. 339, n. 6127, p. 1608-1611, 2013.

GENTLEMAN, R. et al. **The R project for statistical computing – versão 3.1.1**. 2014. Disponível em: <<http://www.r-project.org>>. Acesso em: jun. 2016.

GIBBS, P. E.; SASSAKI, R. 1998. Reproductive biology of *Dalbergia miscolobium* Benth. (Leguminosae – Papilionoideae) in SE Brazil: The effects of pistillate sorting on fruit-set. **Annals of Botany**, v. 81, p. 735-740, 1998.

GIORDANO, L. B.; ARAGÃO, F. A. S.; BOITEUX, L. S. Melhoramento genético do tomateiro. **Informe agropecuário**, v. 24, p. 43-57, 2003.

GOTTSBERGER, G.; SILBERBAUER-GOTTSBERGER, I. Evolution of flower structures and pollination in neotropical Cassiinae (Caesalpinaceae) species. **Phyton**, v. 28, n. 2, p. 293-320, 1988.

GRANER, E. A.; GODOY, C. J.; ORSI, E. W. L.; TOLEDO, F. F.; GODOY, O. P.; ABRAHÃO, J. T. M.; COSTA, J. D.; FILHO, J. M. **Agricultura**. Departamento de Agricultura e Horticultura, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”: Piracicaba, v. 2, p.128-132, 1973.

GRANT, V. The Protection of the Ovules in Flowering Plants. **Evolution**, v. 4, n. 3, p. 179-201, 1950.

GUITIAN, J. Selective fruit abortion in *Prunus mahaleb* (Rosaceae). **American Journal of Botany**, v. 81, p. 1555-1558, 1994.

HARDER, L. D., THOMSON, J. D. Evolutionary options for maximizing pollen dispersal of animal-pollinated plants. **The American Naturalist**, v. 133, p. 323-344, 1989.

HARDER, L. D. Pollen removal by bumble bees and its implications for pollen dispersal. **Ecology**, v. 71, n. 3, p. 1110-1125, 1990.

HAYASHI-TREVIZOR, A. M. Influência da área de reserva legal sobre a biologia da polinização de *Solanum lycopersicum* L. híbrido pizzadoro (Solanaceae). UFSCar Araras: Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente. **Dissertação de Mestrado**, 2014, 56 p.

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; SARAIVA, A. M.; GONÇALVES, L. A iniciativa brasileira de polinizadores e os avanços para a compreensão do papel dos polinizadores como produtores do serviço ambiental. **Bioscience Journal**, v. 23, n. 1, p. 100-106, 2007.

IRWIN, R. E.; BRODY, A. K. Nectar-robbing bumblebees reduce the fitness of *Ipomopsis aggregata* (Polemoniaceae). **Ecology**, v. 80, p. 1703-1712, 1999.

JANZEN, D. H. A note on optimal mate selection by plants. **The American Naturalist**, v. 11, p. 365–371, 1977.

JUDD, W. C., CAMPBELL, C. S., KELLOGGS, E. A.; STEVENS, P. F. Plant systematic – A phylogenetic approach. USA: **Sinauer Associates, Inc.** (Anais), v. 48, n. 4, p. 826-828, 1999.

JULIANO, J. C. **Polinização entomófila na soja**. In: Congresso Brasileiro de Apicultura. Curitiba: Convênio Incra/ FAEP (Anais), p. 235-239, 1976.

KEARNS, C. A.; INOUE, D. W. **Techniques for pollination biologists**. Niwot: University Press of Colorado, 1993, 586 p.

KEVAN, P. G.; PHILLIPS, T. P. The economic impacts of pollinator declines: an approach to assessing the consequences. **Conservation Ecology**, v. 5, p. 1-8, 2001.

KLEIN, A. M.; STEFFAN-DEWENTER, I.; TSCHARNTKE, T. Fruit set of highland coffee increases with the diversity of pollinating bees. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1518, p. 955-961, 2003.

- KLEIN, A. M.; STEFFAN-DEWENTER, I.; TSCHARNTKE, T. Pollination of *Coffea canephora* in relation to local and regional agroforestry management. **Journal of Applied Ecology**, v. 40, p. 837-845, 2003.
- KLEIN, A. M.; VAISSIERE, B. E.; CANE, J. H.; STEFFAN-DEWENTER, I.; CUNNINGHAM, S. A.; KREMEN, C.; TSCHARNTKE, T. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings of the Royal Society of the London B**, v. 274, p. 303–313, 2007.
- KORBECKA, G.; KLINKHAMER, P. G. L. & VRIELING, K. Selective embryo abortion hypothesis revisited – a molecular approach. **Plant Biology**, v. 4, p. 298-310, 2002.
- LEE, T. D. Patterns of fruit and seed production. In: LOVETT-DOUST, J.; LOVETT-DOUST, L. eds. **Plant reproductive ecology patterns and strategies**. New York, USA: Oxford University Press, p. 179-202, 1988.
- LEE, T. D.; BAZZAZ, F. A. Regulation of fruit and seed production in an annual legume, *Cassia fasciculata*. **Ecology**, v. 63, p. 1363-1373, 1982.
- LEE, T. D.; BAZZAZ, F. A. Maternal regulation of fecundity: non-random ovule abortion in *Cassia fasciculata* Michx. **Oecologia**, v. 68, p. 459-465, 1986.
- LEITE, F. B. Função da heteranteria em duas espécies de Tibouchina (Melastomataceae): atração de abelhas e dinâmica de pólen. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP): Programa de Mestrado em Biologia Vegetal. **Dissertação de Mestrado**, 2016, 53 p.
- LEPPIK, E. E. Floral evolution and pollination in Leguminosae. **Annales Botanici Fennici**, v. 3, p. 299–308, 1966.
- LE ROUX, M. M.; VAN WYK, B. E. The systematic value of flower structure in *Crotalaria* and related genera of the tribe Crotalariaeae (Fabaceae). **Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 207, n. 6, p. 414-426, 2012.
- LEWIS, G. P.; SCHIRE, B. D. Leguminosae or Fabaceae? In: KLITGAARD, B. B.; BRUNEAU, A. (eds.) *Advances in Legume Systematics, Part 10, higher level systematic*. Kew: **Royal Botanic Gardens**, p. 1-3, 2003.
- LEWIS, G. P.; SCHIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. Legumes of the World. **Royal Botanic Gardens: Kew**, 2005, 577 p.
- LLOYD, D. G. Sexual strategies in plants. 1. An hypothesis of sexual adjustment of maternal investment during one reproductive session. **New Phytology**, v. 86, p. 69–79, 1980.
- LOWENSTEIN, D. M.; MINOR, E. S. Effect of Number of *Bombus impatiens* (Hymenoptera: Apidae) Visits on Eggplant Yield. **Journal of Economic Entomology**, v. 108, n. 3, p. 1456-1459, 2015.
- LPWG. Legume phylogeny and classification in the 21st century: Progress, prospects and lessons for other species-rich clades. **Taxon**, v. 62, n. 2, p. 217-248, 2013.

- LUO, Z.; ZHANG, D.; RENNER, S. S. Why two kinds of stamens in buzz-pollinated flowers? Experimental support for Darwin's division-of-labour hypothesis. **Functional Ecology**, v. 22, p. 794–800, 2008.
- MAEDA, J. A. et al. Deterioração de sementes de *Crotalaria juncea* e suas consequências em laboratório e campo. **Bragantia**, v. 45, p. 353-352, 1986.
- MANSANO, V. F.; SOUZA, A. L. A new *Swartzia* (Leguminosae: Papilionoideae: Swartzieae) species with trimorphic stamens from Amazonian, Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 147, p. 235–238, 2004.
- MARAZZI, B.; CONTI, E.; ENDRESS P. K. Diversity in Anthers and Stigmas in the Buzz-Pollinated Genus *Senna* (Leguminosae, Cassiinae). **International Journal of Plant Sciences**, v. 168, p. 371–391, 2007.
- MARCHI, P.; SANTOS, I. A. dos. The bees of the genus *Xylocopa* Latreille (Xylocopini, Apidae) of São Paulo State, Brazil. **Biota Neotropica**, v. 13, n. 2, p. 249-270, 2013.
- MARTIN, M. E.; LEE, T. D. Self-pollination and resource availability affect ovule abortion in *Cassia fasciculata* (Caesalpinaceae). **Oecologia**, v. 94, p. 503–509, 1993.
- MATTHIES, D. Plasticity of reproductive components at different stages of development in the annual plant *Thlaspi arvense* L. **Oecologia**, v. 83, p. 105-116, 1990.
- MAYHEW, P. **Discovering evolutionary ecology – bringing together ecology and evolution**. Oxford: Oxford University Press, 2006. 232 p.
- MAZZUCO, K. T. M. Uso da *Canavalia ensiformis* como fitorremediador de solos contaminados por chumbo. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC): Programa de Doutorado em Engenharia Química. **Tese de Doutorado**, 186 p., 2008.
- MOGENSEN, H. L. Ovule abortion in *Quercus* (Fagaceae). **American Journal of Botany**, v. 62, p. 160–165, 1975.
- MORETI, A. C. de C. C.; SILVA, E. C. A.; ALVES, M. L. T. M. F. Observações iniciais sobre a polinização do girassol (*Helianthus annuus* L.) efetuada por *Apis mellifera* L. **Boletim de Indústria Animal**, v.50, n.1, p. 31-34, 1993.
- MÜLLER, H. Two Kinds of Stamens with Different Functions in the same Flower. **Nature**, p. 27-30, 1882.
- NOGUEIRA-COUTO, R. H. **Polinização com abelhas africanizadas**. In: Encontro Sobre Abelhas. Ribeirão Preto: USP/FFCL (Resumo), p. 101-117, 1994.
- NUNES-SILVA, P.; HRNCIR, M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. A polinização por vibração. **Oecologia Australis**, v. 14, n. 1, p. 140-151, 2010.
- OBERMULLER, E. A.; NASCIMENTO, G. B.; GAVA, H. Z.; RIBEIRO, L. F.; SILVA, A. G. O contraste entre síndromes de polinização e sistemas efetivos de polinização e suas perspectivas para ecossistemas associados à Mata Atlântica. **Natureza On line**, v. 6, n. 1, p. 42-47, 2008.

- OLIVEIRA FILHO, J. H.; FREITAS, B. M. Colonização e biologia reprodutiva de mamangavas (*Xylocopa frontalis*) em um modelo de ninho racional. **Ciência Rural**, v. 33, n. 4, p. 693-697, 2003.
- OLIVEIRA, P. E.; MARUYAMA, P. K. Capítulo 3: Sistemas reprodutivos. In: RECH, A. R.; AGOSTINI, K.; OLIVEIRA, P. E.; MACHADO, I. C. **Biologia da Polinização**. 1. ed. Rio de Janeiro: Editora Cultural, 2014, 527 p.
- PAULINO, J. V.; MANSANO, V. F.; TEIXEIRA, S. P. Elucidating the unusual floral features of *Swartzia dipetala* (Fabaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 173, p. 303–320, 2013.
- PINHEIRO, M.; GAGLIANONE, M. C.; NUNES, C. E. P.; SIGRIST, M. R.; SANTOS, I. A. dos. Capítulo 9: Polinização por abelhas. In: RECH, A. R.; AGOSTINI, K.; OLIVEIRA, P. E.; MACHADO, I. C. (Org.). **Biologia da Polinização**. Rio de Janeiro: Editora Projeto Cultural, p. 205-234, 2014.
- PIRANI, J. R.; CORTOPASSI-LAURINO, M. **Flores e abelhas em São Paulo**. São Paulo: EDUSP, 1993.
- POLHILL, R. M. Genisteeae (Adans.) Benth. and related tribes (Leguminosae). **Botanical Systematic**, v. 1, p. 143–368, 1976.
- POLHILL, R. M. *Crotalaria* in Africa and Madagascar. **AA Balkema Publishers**, Rotterdam, 1982.
- POTTS, S.G. Recording pollinator behavior on flowers. In: DAFNI, A.; KEVAN, P. G.; HUSBAND, B. C. **Practical pollination biology**. Cambridge, Ontario-Canada: Enviroquest, Ltd. 2005. p. 330-339.
- PRENNER, G. The asymmetric androecium in Papilionoideae (Leguminosae): definition, occurrence, and possible systematic value. **International Journal of Plant Science**, v. 165, p. 499–510, 2004a.
- PRENNER, G. Floral development in *Daviesia cordata* (Leguminosae: Papilionoideae: Mirbelieae) and its systematic implications. **Australian Journal of Botany**, v. 52, p. 285–291, 2004b.
- PRIMACK, R. B. Longevity of individual flowers. **Annual Review of Ecology and Systematics**, p. 15-37, 1985.
- QUELLER, D. C. Proximate and ultimate causes of low fruit productions in *Asclepias exaltatata*. **Oikos**, v. 44, p. 373–381, 1985.
- RADFORD, A. E.; DICKINSON, W. C.; MASSEY, J. R.; BELL, C. R. Vascular plant systematic. **Harper & Row**, New York, 1974, 891 p.
- RECH, A. R.; BERGAMO, P. J.; FIGUEIREDO, R. de F. Capítulo 8: Polinização abiótica. In: RECH, A. R.; AGOSTINI, K.; OLIVEIRA, P. E.; MACHADO, I. C. (Org.). **Biologia da Polinização**. Rio de Janeiro: Editora Projeto Cultural, 2014, p. 183-204.

- RIBEIRO, A. de M. F.; NOGUEIRA-COUTO, R. H. **Polinização entomófila de soja** (*Glycine max* L.) **cultivar Conquista**. Anais do Congresso Brasileiro de Apicultura. MS: Campo Grande (Resumo), p. 26, 2002.
- RIGNEY, L. P.; THOMSON, J. D.; CRUZAN, M. B.; BRUNET, J. Differential success of pollen donors in a self-compatible lily. **Evolution**, v. 47, p. 915-924, 1993.
- RIGNEY, L. P. Postfertilization causes of differential success of pollen donors in *Erythronium grandiflorum* (Liliaceae): nonrandom ovule abortion. **American Journal of Botany**, v. 82, p. 578-584, 1995.
- RODRÍGUEZ-RIAÑO, T.; ORTEGA-OLIVENCIA, A.; DEVESA, J. A. Biología Floral en Fabaceae. **Monografías del Real Jardín Botánico**, Madrid, 1999a.
- RODRÍGUEZ-RIAÑO, T.; ORTEGA-OLIVENCIA, A.; DEVESA, J. A. Types of androecium in the Fabaceae of SW Europe. **Annals of Botany**, v. 83, p. 109–116, 1999b.
- ROUBIK, D. W. **Ecology and natural history of tropical bees**. Cambridge: Cambridge University Press, 1989. 514 p.
- SAHLI, H. F.; CONNER, J. K. Visitation, effectiveness, and efficiency of 15 genera of visitors to wild radish, *Raphanus raphanistrum* (Brassicaceae). **American Journal of Botany**, v. 94, p. 203–209, 2011.
- SAKAI, Y.; KOLLER, A.; RANGELL, L. K.; KELLER, G. A.; SUBRAMANI, S. Peroxisome degradation by microautophagy in *Pichia pastoris*: identification of specific steps and morphological intermediates. **Journal of Cell Biology**, v. 141, p. 625–636, 1998.
- SALGADO, L. B.; BULISANI, E. A.; BRAGA, N. R.; MIRANDA, M. A. C. de. *Crotalaria juncea*. In: Instituto Agronômico (Campinas). **Instruções agrícolas para o Estado de São Paulo**. 4.ed. Campinas, p.81-82. (Boletim, 200), 1987.
- SEDGLEY, M. Anatomical investigation of abscised avocado flowers and fruitlets. **Annals of Botany**, v. 46, p. 771–777, 1980.
- SILVA, B. B. da.; MENDES, F. B. G.; KAGEYAMA, P. Y. 2009. **Desenvolvimento econômico, social e ambiental da agricultura familiar pelo conhecimento agroecológico**. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz”, Piracicaba. Disponível em: <<http://www.lcb.esalq.usp.br/extension/DESAAFCA/crotalarias.pdf>>. Acesso em: 16 Abr. 2016.
- SIMPSON, M. G. **Plant Systematics**. Elsevier: Academic Press, 2006. 590 p.
- SOLOMON, B. P. Patterns of pre and post fertilization resource allocation within an inflorescence: evidence for interovary competition. **American Journal of Botany**, v. 75, p. 1074-1079, 1988.
- SOUZA, M. M. de.; PEREIRA, T. N. S.; MARTINS, E. R. Microsporogênese e microgametogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica

em maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Degener). **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 6, p. 1209-1217, 2002.

SPRENGEL, C. K. **Das entdeckte geheimnis der natur im baú und in der befruchtung der blumen**. Berlin, 1793. 291 p.

STEPHENSON, A. G. Flower and fruit abortion: proximate causes and ultimate functions. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v. 12, p. 253–279, 1981.

STIRTON, C. H. Petal sculpturing in Papilionoid legumes. In: POLHILL, R. M.; RAVEN, R. H. (Ed.). **Advances in legume systematics**. Kew: Royal Botanical Gardens, 1981, p. 771-788.

STÖCKLIN, J.; FAVRE, P. Effects of plant size and morphological constraints on variation in reproductive components in two related species of *Epilobium*. **Journal of Ecology**, v. 82, p. 735-746, 1994.

SUSKO, D. J.; LOVETT-DOUST, L. Effects of resource availability, and fruit and ovule position on components of fecundity in *Alliaria petiolata* (Brassicaceae). **New Phytologist**, v. 144, n. 2, p. 295-306, 1999.

TEIXEIRA, S. P.; PEREIRA, R. A. S.; RANGA, N. T. Components of fecundity and abortion in a tropical tree, *Dahlstedtia pentaphylla* (Leguminosae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, p. 905-913, 2006.

TUCKER, S. C. Stamen structure and development in legumes, with emphasis in poricidal stamens of caesalpinoid tribe Cassieae. In: WILLIAM, G. D.; RICHARD, C. K. (Eds.). **The anther: form, function, and phylogeny**. Cambridge University Press, Cambridge, p. 236-254, 1996a.

UDOVIC, D.; AKER, C. L. Fruit abortion and the regulation of fruit number in *Yucca whipplei*. **Oecologia**, v. 49, p. 245–248, 1981.

VALLEJO-MARÍN, M.; MANSON, J. S.; THOMSON, J. D.; BARRETT, S. C. H. Division of labour within flowers: heteranthery, a floral strategy to reconcile contrasting pollen fates. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 22, p. 828-839, 2009.

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

VALLEJO-MARÍN, M.; WALKER, C.; FRISTON-REILLY, P.; SOLIS-MONTERO, L.; IGIC, B. Recurrent modification of floral morphology in heterantherous *Solanum* reveals a parallel shift in reproductive strategy. **Philosophical Transaction Royal Society B, Biological Sciences**, v. 369, n. 1649, p. 20130256-20130256, 2014.

VAN DER PIJL, L. Ecological aspects of flower evolution. I. Phyletic evolution. **Evolution**, v. 14, p. 403-416, 1960.

VAN DER PIJL, L. Ecological aspects of flower evolution. II. Zoophilous flower classes. **Evolution**, v. 15, p. 44-59, 1961.

- VAN WYK, B. E.; SCHUTTE, A. L. Phylogenetic relationships in the tribes Podalyrieae, Liparieae and Crotalariae. In: CRISP, M.; DOYLE, J. (Eds.). **Advances in Legume Systematics**, v. 7, p. 283–308, 1995.
- VAN WYK, B. E. Crotalariae. In: LEWIS, G.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. (Eds.). **Legumes of the World**. Royal Botanic Gardens, Kew, p. 273–281, 2005.
- VOGEL, S. Blütenbiologische Typen als Elemente der Sipplgliederung, dargestellt anhand der Flora Südafrikas. **Botanische Studien**, v. 1, p. 1-338, 1954.
- VOGEL, S. Ölblumen und ölsammelnde Bienen. **Tropische und Subtropische Pflanzenwelt**, v. 7, p. 285-547, 1974.
- VOGEL, S. Evolutionary shifts from reward to deception in pollen flowers. In: RICHARDS, A. J. (ed.). **The pollination of flowers by insects**. Linnean Society Symposium Series, London: Academic Press, n. 6, p. 89-96, 1978.
- WASER, N. M.; OLLERTON, J. (eds.). **Plant-pollinator interactions: from specialization to generalization**. Chicago, The University of Chicago Press, 2006, 488 p.
- WESTERKAMP, C. Flowers and bees are competitors - not partners. Towards a new understanding of complexity in specialized bee oves. **Acta Horticulturae**, v. 437, p. 71–74, 1997a.
- WESTERKAMP, C. Keel blossoms: Bee flowers with adaptations against bees. **Flora**, v. 192, p. 125-132, 1997b.
- WESTERKAMP, C.; CLASSEN-BOCKHOFF, R. Bilabiate flowers: The ultimate response to bees? **Annals of Botany**, p. 1-14, 2007.
- WIENS, D.; CALVIN, C. L.; WILSON, C. A.; DAVERN, C. I.; FRANK, D.; SEAVEY, S. R. Reproductive success, spontaneous embryo abortion, and genetic load in flowering plants. **Oecologia**, v. 71, p. 501-509, 1987.
- WILLMER, P. **Pollination and Floral Ecology**. Princeton University Press. Princeton: New Jersey, 2011, 792 p.
- WITTER, S. et al. **As abelhas e a agricultura**. Porto Alegre: EdiPUCRS, 2014.
- YAMAMOTO, M.; BARBOSA, A. A. A.; OLIVEIRA, P. E. A. M. A polinização em cultivos agrícolas e a conservação das áreas naturais: o caso do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.). **Oecologia Australis**, v. 14, n. 1, p. 174-192, 2010.
- YAMAMOTO, M. et al. The role of bee diversity in pollination and fruit set of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* forma *flavicarpa*, Passifloraceae) crop in Central Brazil. **Apidologie**, v. 43, p. 515–526, 2012.
- ZAMBON, V. Biologia da polinização e efetividade de polinizadores em *Solanum melongena* L. (Solanaceae). UFSCar Araras: Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente. **Dissertação de Mestrado**, 2015, 84 p.