

LUANA DE SOUZA PROCHAZKA

**Evolução coordenada entre estratégia
ecológica, nicho ambiental e mutualismos de
defesa e nutrição em uma linhagem de
leguminosas**

Tese apresentada ao Instituto de Pesquisas Ambientais da Secretaria do Meio Ambiente, Infraestrutura e Logística, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de DOUTORA em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais

SÃO PAULO

2025

LUANA DE SOUZA PROCHAZKA

**Evolução coordenada entre estratégia
ecológica, nicho ambiental e mutualismos de
defesa e nutrição em uma linhagem de
leguminosas**

Tese apresentada ao Instituto de Pesquisas Ambientais da Secretaria do Meio Ambiente, Infraestrutura e Logística, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de DOUTORA em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais

ORIENTADOR: DR. ANSELMO NOGUEIRA
CO-ORIENTADORA: DRA. SUZANA ALCANTARA

Ficha Catalográfica elaborada pelo **Serviço de Biblioteca, Mapotecas, Museus, Acervos Arquivísticos e Iconográficos do Instituto de Pesquisas Ambientais**

P963e	PROCHAZKA, Luana de Souza Evolução coordenada entre estratégia ecológica, nicho ambiental e mutualismos de defesa e nutrição em uma linhagem de leguminosas Luana de Souza Prochazka, São Paulo, 2025. 138p. Orientador: Dr. Anselmo Nogueira Tese (Doutorado) - Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente - Instituto de Pesquisas Ambientais da Secretaria de Meio Ambiente, Infraestrutura e Logística, 2025. 1. <i>Chamaecrista</i> 2. Evolução adaptativa 3. Mutualismo I. Autor II. Título. CDU: 582.736
-------	---

BANCA EXAMINADORA

Dr. Anselmo Nogueira (Orientador)

Universidade Federal do ABC (UFABC)

Dr. Alexandre R. Zuntini

Royal Botanic Gardens, Kew (RBG Kew)

Dra. Flávia Delgado Santana

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA)

Dra. Flávia Regina Capelloto Costa

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA)

Dr. Rafael Silva Oliveira

Universidade Estadual de Campinas (Unicamp)

Para as mulheres da minha família que vieram antes de mim.

E para aquelas que encontrei durante o caminho.

*Cada qual a seu modo,
me ajudaram a chegar até aqui.*

*Se avexe não
Toda caminhada começa no primeiro passo
A natureza não tem pressa, segue seu compasso
Inexoravelmente chega lá
Se avexe não
Observe quem vai subindo a ladeira
Seja princesa ou seja lavadeira
Pra ir mais alto, vai ter que suar...
(A natureza das coisas – Accioly Neto)*

AGRADECIMENTOS

*“O que eu sou, eu sou em par
Não cheguei, não cheguei sozinho”
Castanho – Lenine/ Carlos Posada*

Assim como nas interações mutualistas que investiguei ao longo desta tese, este trabalho só floresceu, produziu sementes e chegou mais longe graças a uma rede de apoio diversa, formada por muitas pessoas. Cada pessoa e instituição que esteve ao meu lado durante este período ofereceu recursos essenciais, seja com acolhimento, financiamento, tempo, infraestrutura, cuidado, paciência e tantas outras coisas, que, como água, luz e nutrientes, sustentaram o crescimento desta pesquisa. Sozinha essa semente não germinaria e foi no solo fértil das colaborações, da amizade e do trabalho árduo que ela criou raízes profundas e pôde se desenvolver até chegar à sua forma final.

Agradeço as instituições que acolheram a mim e a essa pesquisa.

A FAPESP pela bolsa concedida (Fapesp 2021/01573-0), e pelo financiamento de Jovem Pesquisador no qual meu projeto está inserido (Fapesp 2019/19544-7).

Ao ICMBIO, ao Instituto das Florestas (MG) e ao COTEC de São Paulo por conceder as autorizações de coleta necessárias para que as atividades de campo pudessem ser realizadas. Um agradecimento especial a toda equipe do P.E. do Rio Preto (MG) e da brigada de incêndio do P.N. da Chapada Diamantina por todo o apoio prestado durante as viagens de campo. Agradeço também a toda equipe de funcionários da Fazenda Experimental Vale do Curu, administrada pela Universidade Federal do Ceará, que tornou nossos dias de trabalho no calor muito mais amenos e divertidos.

Ao Instituto de Pesquisa Ambientais (para sempre como Instituto de Botânica de São Paulo - IBt). O IBt foi minha primeira casa científica, e foi também o meu primeiro contato com o fazer ciência na área da botânica. Sair do IBt em 2014 e voltar em 2020 como aluna de pós-graduação foi um feliz acontecimento.

A Universidade Federal do ABC (UFABC). A UFABC foi um local de muitas descobertas. Além de oferecer estrutura e materiais de consumo para a realização desta tese, foi também onde cursei minha graduação e conheci a linha de pesquisa do meu

orientador. Neste espaço conheci pessoas muito importantes para minha vida, pessoal e profissional e só o Universo sabe qual o caminho eu teria seguido se eu nunca tivesse adentrado nessa instituição.

Agradeço ao meu orientador, Anselmo Nogueira, pelo apoio constante ao longo de toda a jornada. A confiança dele no meu trabalho (quando nem eu mesma tinha), me deu liberdade para explorar ideias e desenvolver minha própria trajetória científica, sempre com a segurança de que eu teria um socorro acadêmico quando precisasse. Sou grata pela paciência nas discussões, pela generosidade em compartilhar conhecimento, pelos ensinamentos no trabalho de campo e pela amizade sincera que criamos ao longo dessa jornada. Mais do que um orientador, você foi um parceiro de pesquisa, que me incentivou a ir além e me ensinou que a ciência se constrói com rigor, curiosidade, colaboração e alegria.

A minha co-orientadora, Suzana Alcantara, por me acompanhar nos meus primeiros passos no mundo da análise comparativa filogenética. Obrigada pela parceria, pela correção dos textos e por me receber em Florianópolis.

Ao meu primeiro núcleo familiar, minha mãe Maria e meu irmão Oscar que nunca soltaram minha mão e sempre me apoiaram em toda a loucura (acadêmica ou não) que eu inventava. Diante de tudo o que passamos, não estaria aqui se não fosse pelo amor incondicional e o incentivo de vocês. Vencemos, e venceremos mais.

Ao Yuri, meu noivo. Conhecer e estar com você por todos esses anos têm sido uma das coisas mais divertidas e inusitadas da minha vida. Obrigada por todo companheirismo e incentivo. Por suportar minhas ausências durante os períodos de campo, por topar minhas loucuras e por sempre me mimar (mesmo que por livre e espontânea pressão).

As amigas de longa data Marcinha e Bruna. Obrigada pela amizade tão sincera, pelos dias de café e cerveja, de choro e de alegria. Vocês caminharam comigo por grande parte da minha carreira acadêmica e deixaram tudo melhor.

As amigas que a pós-graduação me deu, Bruna Campos e Amanda Vieira. Pelo poder das nossas diferenças fizemos o grupo do Sucesso. A jornada até aqui foi mais incrível porque eu pude compartilhá-la com vocês. Obrigada por todos os cafés, por

toda a ajuda com o trabalho e fora dele. Ter construído essa amizade com vocês é um dos meus maiores presentes da pós-graduação (nhoi-nhoi-nhoi).

A todos os membros do Laboratório de Interação Planta-Animal, aos que permanecem e ao que já foram alçar outros voos. Amanda, Bruna, Caian, Dimas, Douglas, Edu, Guilherme, Lucas, Matheus e Tamiris. Obrigada pelas horas de conversa e café, seja discutindo sobre ciência ou sobre a vida. Obrigada por todo apoio nos dias de mutirão para processamento de amostras e para contagem de nódulos radiculares. Um agradecimento especial a Bruna, a Tamiris e mais recentemente ao Matheus que toparam a loucura do campo comigo, mesmo sabendo da cilada em que eles estavam se metendo para desenterrar plantas no meio do campo rupestre, lavar raízes e contar nódulos dia e noite adentro. O caminho seria bem mais tortuoso sem vocês. Obrigado ao Dimas, amigo de longa data e que também foi essencial para a obtenção das medidas dos nectários extraflorais. Obrigada a todas as pessoas que não foram mencionadas, mas que foram essenciais para que esse trabalho fosse concluído.

Finalizo esse longo agradecimento, reconhecendo e agradecendo a força potente e desconhecida que sempre esteve comigo, me fornecendo clareza e sabedoria para perceber os caminhos possíveis e as oportunidades escondidas. Essa força tem alinhado meus caminhos de um jeito extraordinariamente improvável, e me ajudaram a chegar até aqui com a somatória de pequenos acontecimentos, pequenos milagres.

RESUMO

Mutualismos são interações benéficas entre espécies e essas interações desempenham um papel central na diversificação e funcionamento dos ecossistemas. Compreender como essas interações persistem e evoluem em diferentes contextos ecológicos e ambientais é o principal objetivo dessa tese. Investiguei os padrões macroevolutivos associados à evolução de mutualismos em plantas do gênero *Chamaecrista* (L.) Moench (Fabaceae), um grupo amplamente distribuído em ambientes abertos e sazonais do Neotrópico. A partir de uma abordagem integrativa que combina dados de campo, herbário e literatura, explorei se os mutualismos de defesa e nutrição evoluíram em conjunto com mudanças evolutivas em outras características vegetais, como mudanças na estratégia ecológica das plantas e mudanças no nicho das espécies. Inicialmente, investiguei como a evolução de diferentes formas de vida, um proxy para diferentes estratégias ecológicas, esteve associada à evolução do nicho ambiental das espécies. Em seguida, investiguei se a evolução dos nectários extraflorais, estruturas envolvidas no mutualismo de defesa com formigas, evolui de forma coordenada com o nicho hídrico e com características funcionais das plantas. Por fim, investiguei se a intensidade da nodulação, um mutualismo nutricional com bactérias fixadoras de nitrogênio, está evolutivamente associado com mudanças no metabolismo vegetal e nas estratégias de aquisição e usos de recursos. Os resultados obtidos mostram que mudanças na forma de vida das plantas ocorreram repetidamente ao longo da história evolutiva de *Chamaecrista* e estiveram associadas a transições no nicho ambiental das espécies. Além disso, evidenciamos que o tamanho dos nectários extraflorais e a intensidade da nodulação evoluíram em associação com características funcionais das plantas e com a disponibilidade de recursos. Em conjunto, esses resultados indicam que os mutualismos de defesa e nutrição evoluíram de forma coordenada com aspectos funcionais e ecológicos das plantas, sendo moldado tanto por pressões seletivas ambientais quanto por mudanças nas características vegetais que regulam o balanço de custos e benefícios dessas interações.

Palavras-chave: *Chamaecrista*, integração de característica, evolução adaptativa, mutualismo

ABSTRACT

Mutualisms are beneficial interactions between species, and they play a central role in the diversification and functioning of ecosystems. Understanding how these interactions persist and evolve under different ecological and environmental contexts is the main objective of this thesis. I investigated macroevolutionary patterns associated with the evolution of mutualisms in plants of the genus *Chamaecrista* (L.) Moench (Fabaceae), a group widely distributed across open and seasonal environments in the Neotropics. Using an integrative approach that combines fieldwork, herbarium data, and information from literature, I explored whether the evolution of defensive and nutritional mutualisms evolved together with evolutionary shifts in other plant characteristics, such as ecological strategies and species' environmental niches. I first examined whether the evolution of different life forms, a proxy for plant ecological strategies, was associated with shifts in the environmental niche. Next, I tested whether the evolution of extrafloral nectaries, structures involved in defensive mutualisms with ants, occurred in coordination with hydric niche variation and leaf functional traits. Finally, I investigated whether the intensity of nodulation, a nutritional mutualism with nitrogen-fixing bacteria, was evolutionarily associated with changes in plant ecological strategies. The results show that life form transitions occurred repeatedly throughout the evolutionary history of *Chamaecrista* and were associated with shifts in environmental niches. Moreover, we found that both the size of extrafloral nectaries and the intensity of nodulation evolved in association with plant functional traits and resource availability. Together, these findings indicate that defensive and nutritional mutualisms evolved in coordination with ecological and functional aspects of plants, being shaped not only by environmental selective pressures but also by evolutionary changes in traits that influence the net benefits of each mutualistic interaction.

Kew words: *Chamaecrista*, trait integration, adaptive evolution, mutualism

LISTA DE FIGURAS CAPÍTULO I

Figura 1: A Sub-região do Chaco nos Neotrópicos e suas províncias, conforme definido por Morrone (2014) e atualizado por Morrone et al. (2022), mostrando a distribuição de ocorrências de espécies de Chamaecrista com diferentes formas de vida.....	26
Figura 2: Reconstrução ancestral de formas de vida vegetal na linhagem focal Chamaecrista.....	36
Figura 3: Ótimos adaptativos (θ) estimados em cada dimensão de nicho em que os modelos evolutivos foram selecionados como os de melhor ajuste e o traitgrama com uma forma de vida mapeada no nicho atual.....	39

LISTA DE FIGURAS CAPÍTULO II

Figura 1: Esquema ilustrativo da hipótese testada associada a evolução dos nectários extraflorais.....	81
Figura 2: Reconstrução do estado ancestral do tamanho do nectário extrafloral e variação na LMA entre diferentes espécies de Chamaecrista.....	90
Figura 3: Análise do caminho filogenético das relações evolutivas entre o nectário extrafloral e demais características das plantas.....	92
Figura 4: Análise do caminho filogenético das relações evolutivas entre o nectário extrafloral e características do néctar.....	94
Figura 5: Probabilidade de visitação de formigas às plantas em função das características do néctar.....	95

LISTA DE FIGURAS CAPÍTULO III

Figura 1: Procedimentos realizado durante o trabalho de campo para a coleta e amostragem de nódulos radiculares e diversidade da estrutura dos nódulos encontrado em espécies de Chamaecrista.....	118
Figura 2: Relações evolutivas entre forma de vida e características foliares	122
Figura 3: Relações evolutivas entre estratégias funcionais das plantas e nodulação.....	124

LISTA DE TABELAS CAPÍTULO I

Tabela 1: Os quatro eixos de nicho ambiental usados para quantificar a ocupação de nicho das espécies.....	29
--	----

Tabela 2: Predições que associam a evolução das formas de vida vegetal com a dimensão do nicho ambiental.....	34
---	----

Tabela 3: Os quatro eixos de nicho ambiental e seus respectivos modelos evolutivos mais adequados e parâmetros estimados.....	37
---	----

LISTA DE TABELAS CAPÍTULO II

Tabela 1: Comparação de modelos de evolução correlacionados testados na análise do caminho filogenético para o tamanho do nectário.....	91
---	----

Tabela 2: Comparação entre modelos de evolução correlacionados testados na análise do caminho filogenético para características do néctar e visitação de formigas.....	93
--	----

LISTA DE TABELAS CAPÍTULO III

Tabela 1: Modelos evolutivos com melhor ajuste para cada característica investigada e seus respectivos parâmetros estimados.....	123
--	-----

Sumário

Introdução Geral	11
Referências.....	15
 Capítulo 1 <i>Resource availability and disturbance frequency shape evolution of plant life forms in Neotropical habitats</i>	18
Introdução	21
Métodos.....	24
Resultados	35
Discussão	40
Referências.....	45
Material Suplementar.....	53
 Capítulo 2 <i>While water scarcity constrains, higher leaf cost favors the macroevolution of increased investment in ant–plant protection mutualisms in seasonally dry ecosystems</i>	77
Introdução	79
Métodos.....	82
Resultados	90
Discussão	95
Referências.....	99
Material Suplementar.....	103
 Capítulo 3 <i>Evolução divergente do mutualismo planta-bactéria em uma linhagem de leguminosas: Como diferentes estratégias funcionais moldam a evolução da nodulação radicular?</i>	108
Introdução	110
Métodos.....	113
Resultados	121
Discussão	124
Referências.....	129
Material Suplementar.....	134
 Conclusões gerais	135
Referências.....	138

INTRODUÇÃO GERAL

Mutualismos são interações entre diferentes espécies nas quais os parceiros obtêm benefícios líquidos em termos de crescimento, sobrevivência ou reprodução (Boucher et al. 1982; Bronstein 1994). Essas interações fazem parte de um contínuo ecológico que abrange desde relações antagônicas, como predação e parasitismo, até associações positivas, como os mutualismos (Bronstein 1994). Embora mutualismos sejam caracterizados por benefícios recíprocos, sua intensidade e estabilidade variam conforme o contexto ecológico e evolutivo (Leigh 2010; Chamberlain et al. 2014; Hoeksema e Bruna 2015). Além disso, por envolverem a troca de recursos e serviços entre espécies, essas interações implicam em custos fisiológicos os quais podem impactar negativamente a aptidão dos parceiros quando os custos superam os benefícios recebidos (Bronstein 2001; Holland et al. 2002). Assim, a manutenção e a persistência dos mutualismos ao longo do tempo dependem do saldo líquido entre custos e benefícios de cada interação (Leigh 2010).

Nas plantas, os mutualismos são diversos e desempenham papéis importantes em diferentes escalas. Na escala ecológica, essas interações podem modificar o desempenho e a distribuição das espécies, influenciando, por exemplo, o sucesso reprodutivo ou a colonização de novos habitats (p.ex., Stachowicz 2001; Afkhami et al. 2014). Já em escalas evolutivas, os mutualismos podem moldar padrões fenotípicos e promover a diversificação ao longo do tempo (p.ex., Weber e Agrawal 2014; Sprent et al. 2017). Essas interações podem envolver animais, como polinizadores, dispersores de sementes e formigas protetoras, ou microrganismos, como fungos micorrízicos e bactérias fixadoras de nitrogênio. Em todas essas interações, o recurso principal fornecido pelas plantas para o estabelecimento e manutenção dos mutualismos são carboidratos produtos da fotossíntese (Pringle 2016). Do ponto de vista da planta, o custo da interação com outros organismos está associado à alocação de carbono para os mutualistas que poderiam ser direcionados para outras demandas fisiológicas, como crescimento, reprodução ou defesa (Pringle 2016; Deyn 2017). Portanto, a participação em mutualismos exige um sistema refinado de alocação de carbono que é regulado por limitações ambientais ligadas a restrições fotossintéticas, pela demanda interna da planta e pela eficiência do parceiro mutualista. Essa dinâmica torna a manutenção e a

evolução dos mutualismos sensíveis ao contexto ambiental e ao status fisiológico da planta (Kiers et al. 2010; Pringle 2016). Por exemplo, em ambientes onde o custo da aquisição de nutrientes é elevado ou onde a pressão por herbivoria é intensa, os benefícios do mutualismo de nutrição e proteção podem superar os custos da alocação de carbono para os mutualistas. Em contraste, em contextos de alta disponibilidade de recursos ou baixa demanda por defesa, o investimento em mutualistas pode se tornar menos vantajoso e ser reduzido (Heil e McKey 2003; Heath e Tiffin 2007). Assim, os mutualismos não são estáticos ao longo do tempo, mas são moldados por condições ambientais e limitações fisiológicas que alteram o balanço de custos e benefícios da interação (Kiers et al. 2010).

As espécies vegetais possuem estratégias ecológicas distintas, que refletem adaptações às condições ambientais e determinam como as plantas adquirem, alocam e conservam os recursos disponíveis (Grime 1977; Schulze 1982; Westoby et al. 2002). A teoria do espectro econômico prediz que as plantas se distribuem ao longo de um gradiente funcional que varia de estratégias mais aquisitivas a mais conservativas (Wright et al. 2004; Díaz et al. 2016). Espécies com estratégias mais aquisitivas possuem crescimento rápido, alta taxa fotossintética e tecidos foliares ricos em nutrientes, características favorecidas em ambientes com alta disponibilidade de recursos e baixa perturbação. Em contraste, espécies mais conservativas, comuns em habitats mais restritivos, exibem crescimento lento, maior longevidade e estratégias voltadas à tolerância ao estresse e à conservação de recursos. Essas diferenças funcionais refletem *trade-offs* entre crescimento, reprodução e defesa (Grime 1977; Herms e Mattson 1992; Westoby et al. 2002), que influenciam também o modo como as plantas investem em interações mutualistas (Pringle 2016; Deyn 2017). Por exemplo, alguns modelos teóricos propõem que espécies conservativas tendem a investir mais em mutualismos abaixo do solo, como as simbioses com fungos micorrízicos e bactérias fixadoras de nitrogênio, pois essas interações favorecem a aquisição de nutrientes e contribuem para a defesa das plantas (Deyn 2017). Já espécies ruderais ou competidoras, investiriam pouco ou nenhum recurso em mutualismos pois os recursos obtidos pela planta seriam investidos em outras funções, como crescimento e reprodução (Deyn 2017). Apesar desse modelo ser conceitualmente robusto, ele carece de validação empírica abrangente. Por outro lado, alguns modelos matemáticos preveem

que mutualismos que demandam alto custo energético, como os mutualismos de nutrição, são regulados não pela estratégia ecológica, mas sim, pela capacidade fotossintética da planta (Kobayashi et al. 2021). Nesse sentido, o investimento simbiótico depende da capacidade da planta de sustentar o custo metabólico da simbiose de modo que os benefícios superem os custos da interação (Kobayashi et al. 2021). Esse conjunto de modelos teóricos reforça a ideia de que os custos e benefícios da interação podem ser moldados por aspectos intrínsecos e extrínsecos das plantas, e que essas interações não evoluem de forma isolada, mas são moldadas por diferentes fatores como condições ambientais, demandas fisiológicas e estratégias funcionais das linhagens.

As condições ambientais atuam como filtros ecológicos fundamentais que afetam tanto a expressão como a seleção de características funcionais (Lavorel e Garnier 2002). Por exemplo, em contextos edáficos ou climáticos restritivos, certas características das populações de plantas podem ser selecionadas por maximizar o uso eficiente de recursos escassos, reduzir perdas ou tolerar estresse (Ackerly 2003; Craine et al. 2012). Nesse sentido, o ambiente não apenas seleciona estratégias ecológicas distintas, como crescimento rápido ou lento, mas também influencia diretamente os custos e benefícios associados às interações mutualistas (Chamberlain et al. 2014; Hoeksema and Bruna 2015). Por exemplo, em solos pobres em nitrogênio, a simbiose com rizóbios pode proporcionar vantagens nutricionais únicas, enquanto em solos ricos, o custo de manutenção da simbiose pode superar os seus benefícios, tornando a interação neutra ou desvantajosa (Heath e Tiffin 2007; Regus et al. 2017). De modo semelhante, a disponibilidade hídrica e a frequência de distúrbios, afetam tanto o desempenho e a aptidão de estratégias ecológicas divergentes, quanto os benefícios dos mutualismos (p.ex., Leal e Peixoto 2017; da Silva et al. 2020). Dessa forma, fatores abióticos modulam o balanço de custos e benefícios dos mutualismos, afetando não apenas sua manutenção imediata, mas também sua trajetória evolutiva ao longo do tempo e do espaço. Assim, espera-se que pressões ambientais distintas favoreçam diferentes combinações de características funcionais e regimes de interação (p. ex., (Nogueira et al. 2016), resultando em padrões macroevolutivos divergentes entre linhagens (p. ex., Nogueira et al. 2012). Compreender a evolução dos mutualismos, portanto, exige uma perspectiva integrada que considere simultaneamente as propriedades intrínsecas das espécies e os gradientes ambientais sob os quais essas

interações evoluem (Pringle 2016; Deyn 2017). Essa abordagem é particularmente relevante para grupos amplamente distribuídos geograficamente, nos quais a heterogeneidade ambiental impõe pressões seletivas variadas, moldando a diversidade e a estabilidade das interações mutualistas em escalas ecológicas e evolutivas.

Apesar dos avanços no entendimento dos mecanismos ecológicos que regulam os mutualismos, o conhecimento sobre como essas interações evoluíram ao longo do tempo permanece limitado. Especificamente, são escassas as abordagens que integram estratégias ecológicas, condições ambientais e a evolução de características mutualistas em uma perspectiva macroevolutiva. É nesse contexto que essa tese está inserida.

Adotamos uma abordagem comparativa e integrativa para investigar como os mutualismos evoluem em associação com as estratégias ecológicas das plantas e os contextos ambientais em que elas ocorrem e evoluíram. Para isso, utilizamos como modelo uma linhagem do gênero *Chamaecrista* (L.) Moench (Fabaceae). Com cerca de 370 espécies, o gênero possui distribuição pantropical, mas a maior parte de sua diversidade está concentrada na América do Sul, especialmente em ambientes abertos e sazonais que compõem a diagonal seca desse continente. A linhagem objeto desse estudo é constituída por espécies que possuem diferentes formas de vida e diferentes características funcionais, estando sobre forte influência de estressores abióticos, como sazonalidade e fogo. Além disso, as espécies dessa linhagem podem interagir com múltiplos parceiros mutualistas incluindo, formigas protetoras, bactérias fixadoras de nitrogênio e abelhas polinizadoras. A combinação da diversidade funcional e a associação com múltiplos mutualismos ao longo de diferentes gradientes ambientais torna *Chamaecrista* um grupo modelo potente para investigar como forças ecológicas e evolutivas interagem para moldar a evolução dos mutualismos em plantas tropicais.

A tese está estruturada em três capítulos independentes, que, em conjunto, investigam como as interações mutualistas em *Chamaecrista* evoluíram em associação com estratégias ecológicas e condições ambientais. O Capítulo 1 estabelece o pano de fundo ecológico e evolutivo do grupo, investigando como a evolução das formas de vida nas espécies de *Chamaecrista* está associada a evolução do nicho ambiental das espécies, principalmente em eixos associados à disponibilidade de recursos e à frequência de distúrbios. Esse capítulo testa a hipótese de que diferentes formas de vida evoluíram em conjunto com o nicho das espécies, elucidando o espectro de estratégias

ecológicas nas espécies do grupo. O Capítulo 2 examina a evolução do mutualismo de defesa mediado por formigas, testando se os nectários extraflorais evoluíram de forma correlacionada com características funcionais das plantas e com a disponibilidade hídrica. Esse capítulo testa a hipótese que a seleção por interações mutualistas defensivas é favorecida em contextos ecológicos específicos, especialmente quando os custos da herbivoria são altos e o ambiente não impõe limitações de recursos. Por fim, o Capítulo 3 investiga os padrões evolutivos do mutualismo nutricional com bactérias fixadoras de nitrogênio, analisando se a intensidade da nodulação está evolutivamente associada com a evolução de características funcionais das plantas e a estratégias ecológicas. Este capítulo testa se o investimento relativo em nodulação está atrelado à estratégia funcional das linhagens e se há evidências de evolução coordenada entre características foliares e a simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio. Juntos, os três capítulos buscam elucidar os fatores ecológicos e evolutivos que modulam a persistência e a diversificação dos mutualismos em plantas tropicais, dando ênfase nos mecanismos que influenciam os custos e benefícios dessas interações ao longo do tempo.

Referências

- Ackerly, D. D. 2003. Community assembly, niche conservatism, and adaptive evolution in changing environments. University of Chicago Press.
- Afkhami, M. E., P. J. McIntyre, and S. Y. Strauss. 2014. Mutualist-mediated effects on species' range limits across large geographic scales. *Ecol Lett* 17:1265–1273. Blackwell Publishing Ltd.
- Boucher, D. H., S. James, and K. H. Keeler. 1982. The Ecology of Mutualism. *Annu Rev Ecol Syst* 13:315–362.
- Bronstein, J. L. 1994. Our current understanding of mutualism. *Q Rev Biol* 69.
- Bronstein, J. L. 2001. The Costs of Mutualism. *Am Zool* 41:825–839.
- Chamberlain, S. A., J. L. Bronstein, and J. A. Rudgers. 2014. How context dependent are species interactions? *Ecol Lett* 881–890. Blackwell Publishing Ltd.
- Craine, J. M., B. M. J. Engelbrecht, C. H. Lusk, N. G. McDowell, and H. Poorter. 2012. Resource limitation, tolerance, and the future of ecological plant classification. Frontiers Research Foundation.

- da Silva, C. V. C., C. da Silva Goldas, W. Dáttilo, W. Dröse, M. de Souza Mendonça, and L. R. Podgaiski. 2020. Effects of time-since-fire on ant-plant interactions in southern Brazilian grasslands. *Ecol Indic* 112. Elsevier B.V.
- Deyn, G. B. D. 2017. Plant life history and above–belowground interactions: missing links. *Oikos* 126:497–507. Blackwell Publishing Ltd.
- Díaz, S. et al. 2016. The global spectrum of plant form and function. *Nature* 529:167–171. Nature Publishing Group.
- Grime, J. P. 1977. Evidence for the Existence of Three Primary Strategies in Plants and Its Relevance to Ecological and Evolutionary Theory. *Am Nat* 111:1169–1194.
- Heath, K. D., and P. Tiffin. 2007. Context dependence in the coevolution of plant and rhizobial mutualists. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 274:1905–1912. Royal Society.
- Heil, M., and D. McKey. 2003. Protective Ant-plant Interactions as Model Systems in Ecological and Evolutionary Research. Annual Reviews Inc.
- Hermis, D. A., and W. J. Mattson. 1992. The dilemma of plants: to grow or defend. *Q Rev Biol* 67:283–335.
- Hoeksema, J. D., and E. M. Bruna. 2015. Context-dependent outcomes of mutualistic interactions. Pp. 181–202 *in* Mutualism. Oxford University Press.
- Holland, J. N., D. L. DeAngelis, and J. L. Bronstein. 2002. Population dynamics and mutualism: Functional responses of benefits and costs. *American Naturalist* 159:231–244.
- Kiers, E. T., T. M. Palmer, A. R. Ives, J. F. Bruno, and J. L. Bronstein. 2010. Mutualisms in a changing world: An evolutionary perspective. *Ecol Lett* 13:1459–1474.
- Kobayashi, R., S. Yamaguchi, and Y. Iwasa. 2021. Optimal control of root nodulation – Prediction of life history theory of a mutualistic system. *J Theor Biol* 510. Academic Press.
- Lavorel, S., and E. Garnier. 2002. Predicting changes in community composition and ecosystem functioning from plant traits: Revisiting the Holy Grail.
- Leal, L. C., and P. E. C. Peixoto. 2017. Decreasing water availability across the globe improves the effectiveness of protective ant–plant mutualisms: a meta-analysis. *Biological Reviews* 92:1785–1794. Blackwell Publishing Ltd.
- Leigh, E. G. 2010. The evolution of mutualism.
- Nogueira, A., P. J. Rey, J. M. Alcántara, and L. G. Lohmann. 2016. Evidence of between-population differences in natural selection on extra-floral nectaries of the shrub *Anemopaegma album* (Bignoniaceae). *Botany* 94:201–213. Canadian Science Publishing.

- Nogueira, A., P. J. Rey, and L. G. Lohmann. 2012. Evolution of extrafloral nectaries: Adaptive process and selective regime changes from forest to savanna. *J Evol Biol* 25:2325–2340.
- Pringle, E. G. 2016. Integrating plant carbon dynamics with mutualism ecology. *New Phytologist* 210:71–75. Blackwell Publishing Ltd.
- Regus, J. U., C. E. et al. 2017. Nitrogen deposition decreases the benefits of symbiosis in a native legume. *Plant Soil* 414:159–170. Springer International Publishing.
- Schulze, E. D. 1982. Plant life form and their carbon, water and nutrient relations. P. *in* *Physiological Plant Ecology II. Encyclopedia of plant Physiology*.
- Stachowicz, J. J. 2001. Mutualism, Facilitation, and the Structure of Ecological Communities. *Bioscience* 51:235–246.
- Westoby, M., D. S. Falster, A. T. Moles, P. A. Vesk, and I. J. Wright. 2002. Plant ecological strategies: Some leading dimensions of variation between species. *Annu Rev Ecol Syst* 33:125–159.
- Wright, I. J., P. B. et al. 2004. The worldwide leaf economics spectrum.

CAPÍTULO 1

Resource availability and disturbance frequency shape evolution of plant life forms in Neotropical habitats

Capítulo publicado na revista *New phytologist* em 21 de fevereiro de 2024

DOI: <https://doi.org/10.1111/nph.19601>

Resource Availability and Disturbance Frequency Shape Plant Life Forms in Neotropical Habitats

Luana S. Prochazka^{1,5*}, Suzana Alcantara², Juliana Gastaldello Rando³, Thais Vasconcelos⁴, Raquel C. Pizzardo⁴, and Anselmo Nogueira⁵

¹ Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, Instituto de Pesquisas Ambientais, São Paulo, SP, Brazil.

² Departamento de Botânica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil.

³ Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Centro das Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Oeste da Bahia, Barreiras, BA, Brazil.

⁴ Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of Michigan, Ann Arbor, MI 48109, USA.

⁵ Laboratório de Interações Planta-Animal (LIPA), Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC, São Bernardo do Campo, SP, Brazil.

*Corresponding author: prochazka.luana@gmail.com

ORCID

Luana de Souza Prochazka 0000-0002-7443-3963

Suzana Alcantara 0000-0001-9666-460X

Juliana Gastaldello Rando 0000-0002-3714-8231

Thais Vasconcelos 0000-0001-9991-7924

Raquel C. Pizzardo 0000-0002-5122-9994

Anselmo Nogueira 0000-0002-8232-4636

Total word count (include only Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion)	6470	Acknowledgements:	116
Summary:	197	Author contributions	63
Introduction:	1320	No. of figures:	3 (All in colours)
Materials and Methods:	2644	No. of Tables:	3
Results:	733	No of Supporting Information files:	7 (Tables S1-S4, Methods S1, Figs S1 and S2)
Discussion:	1773		

Summary

- Organisms use diverse strategies to thrive in varying habitats. While life history theory partly explains these relationships, the combined impact of resource availability and disturbance frequency on life form strategy evolution has received limited attention.
- We use *Chamaecrista* species, a legume plant lineage with a high diversity of plant life forms in the Neotropics and employ ecological niche models and comparative phylogenetic methods to examine the correlated evolution of plant life forms and environmental niches.
- Chamaephytes and phanerophytes have optima in environments characterized by moderate water and nutrient availability coupled with infrequent fire disturbances. In contrast, annual plants thrive in environments with scarce water and nutrients, alongside frequent fire disturbances. Similarly, geophyte species also show increased resistance to frequent fire disturbances, although they thrive in resource-rich environments.
- Our findings shed light on the evolution of plant strategies along environmental gradients, highlighting that annuals and geophytes respond differently to high incidences of fire disturbances, with one enduring it as seeds in a resource-limited habitat and the other relying on reserves and root resprouting systems in resource-abundant habitats. Furthermore, it deepens our understanding of how organisms evolve associated with their habitats, emphasizing a constraint posed by low-resource, high-disturbance environments.

Keywords: adaptation, *Chamaecrista*, climate, ecological opportunity, legumes, macroevolution, niche, South America.

Introduction

Plant form and function are exceptionally diverse in the tropics, but are unevenly spread across environmental gradients (Schulze, 1982; Ewel & Bigelow, 1996; Westoby *et al.*, 2002; Díaz *et al.*, 2016). The plant strategy theory predicts that plants have a set of functional features composing different strategies to survive in environments with varying resource availability and disturbance frequency (Grime, 1977). For instance, habitats that restrict biomass production due to low water and nutrient availability are often inhabited by plants with stress tolerant strategies. Stress-tolerant plants are often perennial and grow slowly, keeping their organs for long periods. They often have some resource storage strategy, thus maximizing resource exploitation under temporarily favourable conditions (Grime, 1977). On the other hand, habitats that impose frequent losses of plant biomass via disturbance, such as fire or herbivory, are often inhabited by plants with a ruderal strategy. Ruderal plants, commonly annual plant species, are short-lived and grow fast, maximizing seed production over biomass accumulation (Grime, 1977; Friedman, 2020). Alternatively, disturbance-prone habitats are also often inhabited by plants with larger storage tissues, commonly underground organs, such as rhizomes, lignotubers, and xylopodia with a higher capacity to resprout (Bellingham & Sparrow, 2000; Pausas & Keeley, 2014). Finally, plants with competitor strategies inhabit habitats with greater resource availability and less disturbance frequency. These plants can obtain resources from the environment quickly and have a high investment in biomass, and most have a significant investment in height growing (Grime, 1977).

The traditional plant life form classification (Raunkiaer, 1934) has been commonly used as a proxy to plant strategies, allowing to test hypotheses regarding the relationship between habitats and plant traits (Schulze, 1982; Shary *et al.*, 2020; Irl *et al.*, 2020; Boyko *et al.*, 2023). This classification summarizes structural and functional traits that indicate habitat preferences and ecological and resistance plant strategies. For instance, therophytes life forms, here also called annual life forms, have rapid growth and greater investment in rapid reproduction that allow these species to escape disturbance events or unfavourable periods over the year, such as dry seasons, through a high production of dormant seeds that germinate when favourable periods return (Friedman, 2020). Thus, annual life forms can also be classified as stressor scape because their life cycle is adjusted when environmental conditions favour their growth and reproduction

(Bandurska, 2022). However, short growing seasons or frequent disturbances may prevent seed formation, so annual forms become less fit, and other life forms, like geophyte forms with underground buds and storage systems, can reach higher success under these conditions (Chapman & Crow, 1981; Tonnabel *et al.*, 2018). The water and photosynthates stored in the underground organs allow germinating buds to retake growth and biomass accumulation after disturbances (Silva & Rossatto, 2019), favouring plant survival when resource availability is seasonally limited (Pausas *et al.*, 2018). Water and nutrient storage in the underground system of geophytes constitutes a stress avoidance strategy, preventing disruption in plant cells during unfavourable periods (Bandurska, 2022). On the other hand, non-geophytic perennial life forms that increase biomass allocation in height growth, such as chamaephytes and phanerophytes, are mainly found in habitats with high water availability and low disturbance intensity (Grime, 1977; Irl *et al.*, 2020). These habitats favour competitive strategies with plants with greater height investment, having more light acquisition and advantages over other plant life forms that do not invest in height growth (Schulze, 1982; Rees & Long, 1992).

Associations between plant life forms and habitats with varying resource availabilities and disturbance intensity have also been observed at the macroevolutionary scale. For instance, a recent multi-clade analysis revealed that annual life forms more often evolve in habitats prone to extreme heat (Boyko *et al.*, 2023). Similarly, the evolution of annual life forms among *Oenothera* species is associated with the occupation of arid regions (Evans *et al.*, 2005). Furthermore, the evolution of perennial forms during Montiaceae diversification is related to the occupation of montane habitats, where colder conditions limit biomass production (Ogburn & Edwards, 2015). Also, resprouting life forms in *Leucadendron*, *Mimosa*, and *Andira* evolved under increased fire frequency (Simon *et al.*, 2009; Tonnabel *et al.*, 2018). While there are insightful studies, the evolutionary dynamics of plant life forms and their environmental niches remain understudied, especially in the Neotropics. In addition to a few studies, it is necessary to detect potential limitations in the procedures adopted so far. For example, the dichotomy between annuals and perennials may be simplistic to capture specific correlation patterns between environmental features and life forms. For instance, certain environmental conditions, such as disturbance frequency, may select annuals and perennials with a resprouting strategy while

excluding non-resprouting perennials (Keeley *et al.*, 2011). Moreover, different plant life forms can also evolve in response to multiple factors, including frequent disturbances in fire-prone habitats, leading to biomass loss and variable environmental resource availability, such as water and soil nitrogen, which could constrain plant biomass production. The impact of multiple environmental gradients on the evolution of life history strategies in plants, particularly whether they correlate with the evolution of annuals, non-resprouting, and resprouting perennials, has been seldom explored, highlighting the existing knowledge gap.

The Neotropical region encompasses a wide range of environmental gradients and an enormous plant diversity (Hughes *et al.*, 2013; Morrone, 2014). The Neotropical flora is estimated to include approximately 118,000 species of vascular plants (Raven *et al.*, 2020). This region encompasses a mosaic of physiognomies and habitats, spanning from tropical forests within the Amazonian domain to seasonally dry and warm forests in the Caatinga domain, and further to the climatically seasonal, rockier, and nutrient-poor soils found in the *Campos Rupestres* ('rocky fields') (Hughes *et al.*, 2013). Furthermore, the eastern Neotropics, i.e., the Chacoan subregion (Morrone *et al.*, 2022), have undergone significant climatic shifts in the last 30 million years, including glaciations and the Open Diagonal formation, a region with seasonal rainfall that stretches from northeastern Brazil to northern Argentina (Lavina & Fauth, 2016). In addition, some areas of the Neotropics have high endemism, such as the *Campos Rupestres*, a mountainous region in eastern Brazil recognized for its high floristic singularity (Colli-Silva *et al.*, 2019). This region harbours around 5,000 species (Silveira *et al.*, 2016; BFG *et al.*, 2018) with various life forms, including resprouting, shrub, and herbaceous species (Rapini *et al.*, 2008). Despite this vast floristic diversity in the Chacoan subregion, little is known about how evolutionary processes have shaped the evolution of the environmental niche and life form in diversified plant lineages.

This study explores a *Chamaecrista* lineage (Fabaceae) mainly occurring in the Chacoan subregion (Figure 1a) to investigate whether plant life form evolution is associated with distinct changes in environmental niches. As each plant life form represents a distinct set of traits reflecting a plant strategy to inhabit different parts of environmental gradients, our general hypothesis is that the evolution of plant life forms occurs jointly with the evolution of the environmental niche. In this case, we would

expect an absence of environmental niche conservatism (Crisp & Cook, 2012) since descendant lineages would occupy distinct environmental conditions from their ancestors due to transitions associated with the evolution of life forms. More specifically, we hypothesize that 1. Life forms with short-lived and lower biomass production, such as annual species, are evolutionarily correlated with seasonal environments with less resource availability over time, while perennial species with higher biomass production are evolutionarily associated with environments having greater resource availability; 2. Life forms with escape or avoidance strategies, such as rapid seed production in annuals or large underground storage systems in geophytes, are evolutionarily associated with environments having a higher disturbance frequency and less water availability during the dry season than species lacking these resistance strategies. Based on these hypotheses, we constructed three evolutionary predictions (see Methods) connecting the occupation of distinct environmental conditions with transitions across the four life forms found in *Chamaecrista*. Our primary motivation is to bridge a gap in understanding the evolution of multiple life forms across variable environmental and disturbance gradients.

Material & Methods

Study group and phylogenetic background

Our study group is a lineage within *Chamaecrista* (L.) Moench (Fabaceae) encompassing 135 species (section *Baseophyllum* and section *Chamaecrista*) (Souza et al., 2021), of which 68 occur in South America. This group includes sub-shrubs, shrubs, and tree species (Souza et al., 2021), with many plant life forms (Figure 1b-f). Some species have xylopodium, underground woody systems that harbour germinating buds, thus becoming able to regrow after disturbance events (Conceição et al., 2009; Rando et al., 2016; Souza et al., 2021). This *Chamaecrista* lineage has diversified in the last 30 million years (Rando et al., 2016), likely originating in the Neotropics. In addition to the diversity of plant structure, species diversification occurred in the Chacoan subregion in the Neotropics (Figure 1a). This region has a variety of ecosystems with wide environmental variation (Hughes et al., 2013; Morrone, 2014).

We used a sample of 200 dated phylogenetic trees from the posterior distribution inferred in the Bayesian analysis (Vasconcelos et al., 2020). This phylogenetic

hypothesis is the most comprehensive dated tree available for the group, which used four molecular markers including 49 species (Rando *et al.*, 2016; Vasconcelos *et al.*, 2020). Divergence time was estimated using two calibration points (Rando *et al.*, 2016; Vasconcelos *et al.*, 2020). We pruned our sample of phylogenetic trees to our study group, sections *Baseophyllum*, and *Chamaecrista*, removing two species not occurring in South America. These two species (*C. caribae* and *C. lineata*) derived from a single dispersal event from South to Central America (Souza *et al.*, 2021), and have little relevance to understanding how the group evolved in South America. We retained a single terminal under *C. nictitans*, eliminating a taxonomic synonym and two varieties due to the difficulty in recognizing and potential misidentification of infraspecific taxa (BFG *et al.*, 2022). Although infraspecific taxa commonly do not hold an evolutionary meaning (Hamilton & Reichard, 1992), this is often not the case in species-rich genera in the Neotropics, especially in the genus *Chamaecrista* (Baker-Méio & Marquis, 2012). Therefore, we kept some varieties in the phylogeny precisely because they indicate distinct evolutionary lineages, as in *C. tragacanthoides* var. *rasa* and *C. tragacanthoides* var. *tragacanthoides* or when varieties have different life forms (e.g., *C. desvauxii* varieties). In summary, the phylogenetic trees of *Chamaecrista* remained with 44 taxa. The name and authorship of all species used here are in Supporting Information Table S1.

Plant life form classification

We used the same classification utilized by Irl *et al.* (2020), which is an adaptation to the Raunkiaer system to classify *Chamaecrista* species into plant life forms. Hence, we considered four plant life forms:

- i. Therophyte: Annual woody plants whose shoot and root systems die after completing their life cycle, including seed production, in the favourable season of a single year.
- ii. Chamaephyte: Perennial woody plants smaller than 50 cm.
- iii. Phanerophyte: Perennial woody plants taller than 50 cm.
- iv. Geophyte: Perennial woody plants with reduced shoot system and developed root system that holds underground storage organs.

Our study considered *Chamaecrista* species as geophytes if plants have extensive woody root holding buds, i.e., xylopodium (Conceição *et al.*, 2009; Rando *et*

al., 2016; Souza *et al.*, 2021). To classify species into those categories, we utilized the information provided by taxonomic revisions and other studies on *Chamaecrista*. The plant life form classification and the references used are in Supporting Information Table S1.

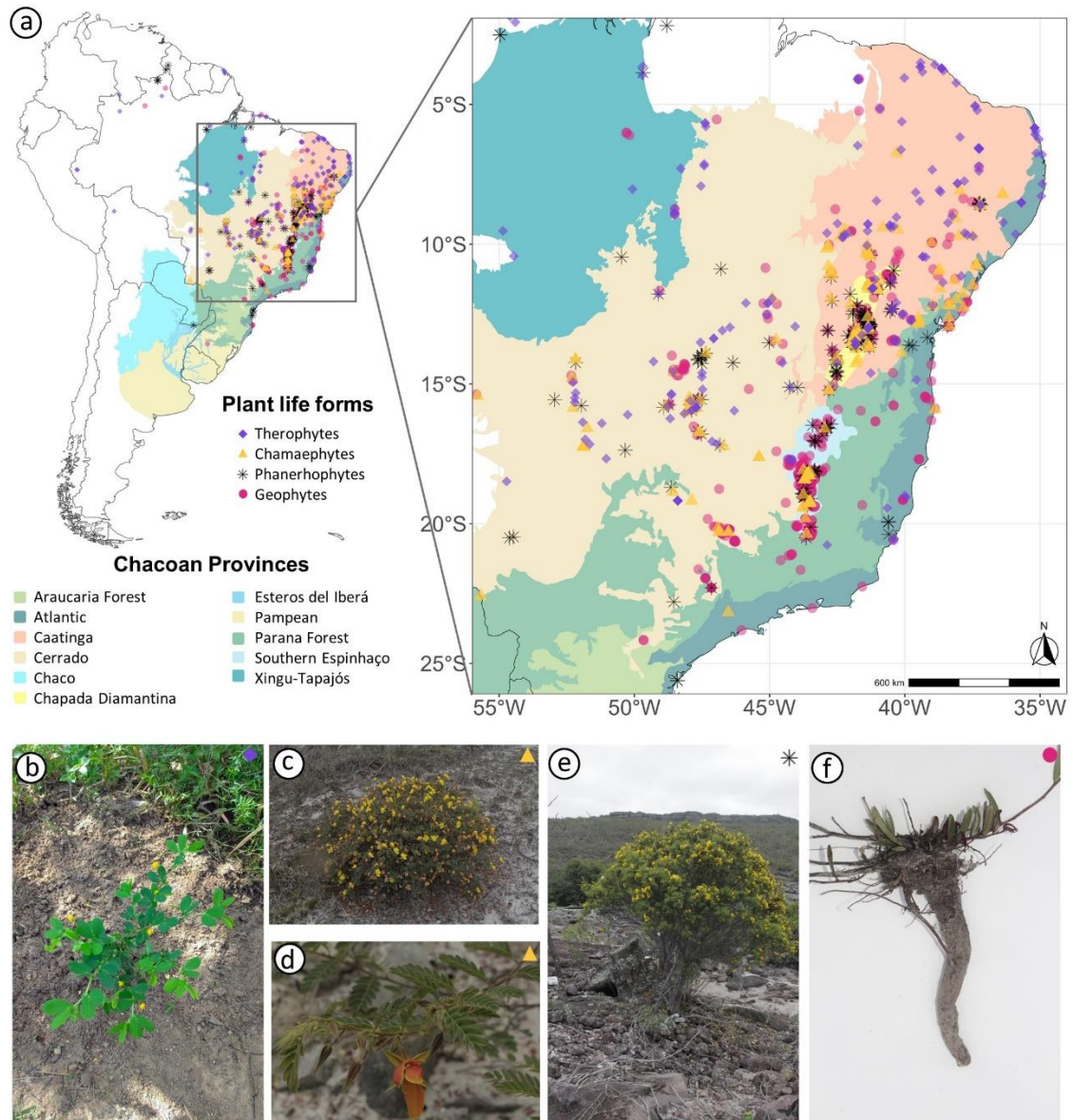


Figure 1: The Chacoan Subregion in the Neotropics and its provinces, as defined by Morrone (2014) and updated by Morrone *et al.* (2022), showing the distribution of occurrences of *Chamaecrista* species with different life forms. (a) Plant life form distribution along the provinces in the Chacoan subregion. Each color in the map corresponds to a province, and each symbol corresponds to a different plant life form

occurrence. The *Campo Rupestre* vegetation includes the Chapada Diamantina and Southern Espinhaço provinces. (b) *Chamaecrista rotundifolia*, a therophyte species. (c) *Chamaecrista ramosa*, a chamaephyte species. (d) *Chamaecrista pascuorum*, a chamaephyte species. (e) *Chamaecrista confertifomis*, a phanerophyte species. (f) *Chamaecrista simplifecta*, a geophyte species. The xylopodium in this species is underground.

Characterizing environmental niches

To test our hypotheses linking plant life form evolution with environmental niche changes, we first characterize the species' β niche. The β niche is defined as macrohabitat and climate factors influencing larger scale species distributions (Ackerly *et al.*, 2006). To do this, we use species occurrence data and environmental variables, we build ecological niche models. The georeferenced occurrence data for species was extracted from three online databases: Global Biodiversity Information Facility (GBIF) (<http://gbif.org>), Re flora Virtual Herbarium (<http://reflora.jbrj.gov.br>), and Environmental Information Reference Center (<http://splink.cria.org.br>). The cleaning procedure in the occurrence data involved several filter steps that aimed to improve the final dataset, removing: 1) duplicate records, 2) records without expert identification, and 3) records missing accurate geographic information, i.e., missing or incorrect geographic coordinates or non-informed sampling locality (see Supporting Information Methods S1 for details on filters). After cleaning, we checked all occurrences on Google Earth to verify their plausibility. We also selected ten environmental variables that characterize climatic, edaphic, and disturbance conditions that could potentially influence the niche occupation of each species. The spatial resolution used in environmental variables was 30 seconds ($\sim 1 \text{ km}^2$). The ten selected variables represented environmental gradients that can impact plant fitness via resource availability (water and nutrients), metabolic rates (temperature), and survival rates (fire frequency) (Guisan & Zimmermann, 2000; Mod *et al.*, 2016). Details of each environmental layer used in modelling are in Supporting Information Methods S1.

We built environmental niche models using the maximum entropy algorithm implemented in the Maxent 3.4.4 (Phillips *et al.*, 2006; Phillips & Dudík, 2008). Maxent is an algorithm that uses species occurrence data and environmental variables to predict

the environment suitability score of an area (Phillips *et al.*, 2006; Phillips & Dudík, 2008). We choose Maxent as a modelling algorithm because it is recognized for good results in inferring species niches (Searcy & Shaffer, 2016; Ray *et al.*, 2018; Ahmadi *et al.*, 2023), including in studies investigating niche evolution (Evans *et al.*, 2009; Mitchell *et al.*, 2018; Gorel *et al.*, 2019; Grant & Kalisz, 2020). The Maxent algorithm uses the environmental layers to extract the environmental values in occurrence data and to create a background sample. Considering that the models would be built for multiple species and would later be compared with each other, and that the predicted suitability map generated by Maxent with random background or by background weighting is consistent and comparable (Ahmadi *et al.*, 2023), we built our models with 10 thousand background points spread over our study area, i.e., South America. We excluded species with fewer than three occurrences, resulting in the removal of three species (*C. coriacea*, *C. cytisoides*, and *C. unijuga*) from the phylogenetic trees. This left us with 41 taxa for modeling procedures and subsequent comparative phylogenetic analyses. As most species had few occurrences (mean occurrences per species = 30.19, sd = 19.60), we only utilized the ‘linear’ and ‘quadratic’ features in Maxent (Elith *et al.*, 2011). To avoid spatial pseudoreplication (Guisan *et al.*, 2017), we excluded occurrences in the same grid cell for each species. In summary, we used 1238 occurrences in the models. The species with the highest occurrences was *C. blanchetti* (82 occurrences), and the species with the lowest occurrences was *C. anceps* (3 occurrences). We evaluated models by cross-validation procedures, utilizing two metrics for model predictive performance. For species with more than ten occurrences, we applied 10-replicate cross-validation, splitting our occurrence data into training and testing and averaging AUC values over replicates. Average AUC values greater than 0.75 were considered a reliable predictive performance (Phillips & Dudík, 2008). For species with occurrences between three and ten, we applied a cross-validation with replicates equal to the number of occurrences. We then evaluated models by their average AUC values and the statistical tests proposed by (Pearson *et al.*, 2007), whose significant results indicated a reliable predictive performance. All details of environmental niche modelling and their results are provided in the Supporting Information Methods S1.

The predicted suitability map generated by Maxent is a proxy for the environmental conditions necessary for a species to live and reproduce. Therefore, we can use it to

quantify species' tolerance or occupancy along species' different environmental dimensions (Evans *et al.*, 2009; Warren, 2012). We used the quantitative metrics described by Evans *et al.*, (2009) to extract the predicted niche occupancy profile of the species for the four environmental niche dimensions (Table 1). The predicted niche profile is a quantitative metric used to extract the environmental values from the suitability map, considering the probability of the species occurring in the study area (Evans *et al.*, 2009). We applied this procedure using the 'pno' function in the *phyloclim* package (Heibl & Calenge, 2018).

Table 1: The four environmental niche axes used to quantify species' occupancy following Evans *et al.* (2009).

code	environmental variable	Biological interpretation	References
Bio18	Precipitation of the warmest quarter (mm)	Water availability during the plant growth period	(Fick & Hijmans, 2017)
nitrogen	Nitrogen concentration in the first 30-cm soil profile (cg/Kg)	Soil nitrogen availability	(Poggio <i>et al.</i> , 2021)
Bio17	Precipitation of the driest quarter (mm)	Water deficit in dry season	(Fick & Hijmans, 2017)
fire	Average annual fire frequency between the years 1999-2019 (number of fires/year)	Frequency of disturbances (plant aerial part loss)	BD Queimadas – INPE (https://queimadas.dgi.inpe.br/)

Estimating the evolution of environmental niche

Our main hypothesis posits non-conservative evolution of species' environmental niches. Initially, we assessed whether environmental niches were evolutionarily conserved in our study group using Warren *et al.* (2008) comparative methods. We employed the D and I metrics, measuring niche overlap on suitability map generated by environmental niche models. The D and I metrics vary from '0' (no overlap) to '1' (total overlap). D metric is based on ecological literature and corresponds to Schoener's (1968) statistic, while I metric is based on Hellinger distance (Warren *et al.*, 2008). Both metrics were chosen because, unlike D, the I metric do not carry any biological

assumptions concerning the meaning of local species densities. We assessed niche evolution over the four environmental gradients by quantifying D and I metrics on niche occupancy profiles for each niche dimension (section 2.3). To quantify niche conservatism, we calculated the age-range correlation (ARC) between niche overlap metrics (D and I) and species divergence time (Fitzpatrick & Turelli, 2006; Warren *et al.*, 2008) using the “niche.overlap” and “age.range.correlation” functions in the *phyloclim* package (Heibl & Calenge, 2018).

Estimating the evolution of plant life forms

To estimate the ancestral plant life forms in our study group, we used a Bayesian approach with stochastic character mapping (SIMMAP) (Bollback, 2006). First, we assessed which macroevolutionary model would better fit the evolution of plant life forms in each phylogenetic tree using the ‘corHMM’ function in the corHMM package (Beaulieu *et al.*, 2021). This function was utilized to calculate maximum likelihood estimates of transition rates between life forms. In some models, we incorporated the “hidden” rate changes (Boyko and Beaulieu, 2021). Altogether, we created nine models by adjusting the transition (Q) matrix. The initial three models assumed either equal (ER model), symmetric (SYM), or completely variable (ARD model) transition rates, presuming homogeneity in generating distinct states at the tips and ancestral nodes along the branches of the *Chamaecrista* clade. The subsequent six models incorporated heterogeneity – hidden rate changes – allowing multiple processes to influence plant life form evolution across the phylogeny. In these models, we included two rate categories (i.e., transition matrices), permitting variations between subclades in the phylogeny (R1 and R2, rate.cat = 2). Among them, the first models encompassed two equal-rate (ER/ER model), two symmetric-rate (SYM/SYM), and two all-different-rate (ARD/ARD model) matrices. We also constructed three mixed models: ER/SYM, ER/ARD, and SYM/ARD two-matrices. In all hidden rate change models, we allowed differences in the transitions between rate categories ($R1 \rightarrow R2$ and $R2 \rightarrow R1$). We selected the best-fit model by comparing the AICc values of each model in each phylogenetic tree (Burnham & Anderson, 2002).

In 99.5 % of phylogenetic trees (199 of 200), the simplest ER model (equal rates without hidden rate changes) was selected as the best macroevolutionary model.

Therefore, this model was used to reconstruct the ancestral state of plant life forms. To incorporate the uncertainty of phylogenetic reconstructions into ancestral state estimates, we generated 2000 stochastic character maps (SIMMAPs), 10 SIMMAP's for each phylogenetic tree under the ER model using the `make.simmap` function implemented in `phytools` (Revell 2012). We used the “`describe.simmap`” in the `phytools` R package to summarize SIMMAP estimates (Revell 2012).

Evolutionary correlation between plant life form and environmental niche

We tested the evolutionary correlation between plant life forms and disturbance frequency and resource availability (see predictions in Table 2) using a model selection framework comparing different evolutionary models for continuous-scaled traits (Beaulieu *et al.*, 2012). As we are interested in investigating whether the evolution of different life forms is associated with the occupation of different environments, we modelled the evolution of niche occupancy (continuous traits) as a function of plant life forms (discrete traits). First, we transformed niche occupancy profiles (see section 2.3) to a natural logarithm scale. A natural logarithm scale is recommended because the phenotypic changes among species are represented proportionally (Harmon, 2018). Also, natural-log values better conform to the Brownian motion, an assumption underlying evolutionary models (O'Meara *et al.*, 2006; Harmon, 2018; Vasconcelos *et al.*, 2021). Second, we sampled 500 values of each environmental variable (Table 1) based on the probability of species' profile niche occupancy. We then calculated the mean and standard error for each environmental variable using our occupancy values samples, assigning a unique value to each species. Hence, we analyzed continuous trait evolution in terms of the proportionality of changes over mean occupancy values. As for the discrete traits, we use each of the 2000 SIMMAP's to represent the estimated ancestral life form on nodes of phylogenetic trees.

We considered seven evolutionary models: two based on the Brownian motion (BM) and five based on the Ornstein-Uhlenbeck (OU) process. BM models essentially describe stochastic processes, i.e., when the phylogenetic distance among species explains the difference between species' traits. At the same time, OU models describe stochastic processes with additional directional processes, such as stabilizing selection or constraints. We also included the White noise (WN) model as the null model in our

selection procedure to verify whether our data have no phylogenetic structure and whether trait values vary around a global mean (Cooper et al., 2016; see also Grabowski et al., 2023 for a fruitful discussion about the use of OU models). We fitted the evolutionary models to our data by utilizing the ‘OUwie’ function in the OUwie package, and the null model was fitted with the “fitContinuous” function in the Geiger package. All models were fitted to all 2000 estimates of plant life forms evolution.

BM models assume that the traits evolve via stochastic changes over time, a process whose intensity is given by an evolutionary rate (σ^2) (Harmon, 2018). OU models also assume that the traits evolve via stochastic changes over time, but they additionally consider directional changes towards some optimum value (θ) under some attraction force (α), thus restricting trait values around an optimum value (Beaulieu *et al.*, 2012). The seven evolutionary models applied to the data were: BM1: BM model with a single σ^2 value for all life forms; BMS: BM model with distinct σ^2 values for each life form; OU1: OU model with a single σ^2 , α and θ values for all life forms; OUM: OU model with a single σ^2 and α values for all life forms, but with distinct θ values for each life form; OUMA: OU model with a single σ^2 value for all life forms, but with distinct α and θ values for each life form; OUMV: OU model with a single α value for all life forms, but with distinct σ^2 and θ values for each life form; and OUMVA: OU model with distinct σ^2 , α and θ values for each life form (Beaulieu *et al.*, 2012). The best fit under BM or OU1 models would indicate that plant life forms and environmental niche optima have evolved independently in the study plant lineage. On the other hand, the best fit under the OUM, OUMA, OUMV, or OUMVA models would indicate plant life forms and environmental niche optima are evolutionarily correlated in the studied plant lineage. Finally, the best fit under the WN model would indicate that niche evolution is not associated with the lineage's evolutionary history.

To evaluate model reliability, we checked model estimates. We removed those that were biologically unrealistic, i.e., those that estimate the optimum value (θ) parameter outside the range of values occupied by species. We also checked the Hessian matrix associated with each model and discarded those with negative eigenvalues (Beaulieu *et al.*, 2012). Then, we evaluated the model fit to our data by the ΔAICc . We considered the lowest ΔAICc as the best fit. When ΔAICc difference between the best and second best models was smaller than two units, we consider it a tie and do not choose any

model as the best (Burnham & Anderson, 2002; Alencar *et al.*, 2017). After evaluating model reliability and fit, we analyzed parameter estimates under the best-fit model in each SIMMAP to verify our evolutionary predictions (Table 2). The predictions and interpretations related to our hypothesis are described in Table 2.

Table 2: Predictions associating the evolution of plant life forms with environmental niche dimension. Each prediction expects a set of θ parameter estimates from best-fit evolutionary models linked to its biological interpretation.

Predictions	Expected θ values	Biological interpretation
P1: Therophytes have their adaptive optimum in niches with lower water availability during the plant growing season (bio18) and lower soil nitrogen availability than perennial plant forms.	For bio18 and nitrogen axes: $\theta_{\text{therophytes}} < \theta_{\text{chamaephytes}}, \theta_{\text{phanerophytes}} \text{ and } \theta_{\text{geophytes}}$	Low availability of water and nitrogen resources limits plant growth. In general, perennial plant strategies are slow-growing and produce more biomass than annual plants, thus requiring high resource availability and becoming selectively disadvantageous in environments with low water and nutrient availability. In contrast, therophytes would be selectively favoured in these environments due to their short-lived and lower biomass production, reproducing soon during the growing season, allowing them to persist as seeds.
P2: Non-resprouting perennial strategies, i.e., chamaephytes and phanerophytes, have their adaptive optima in niches with a lower water deficit in the driest period (bio17) than therophytes and geophytes.	For the bio17 axis: $\theta_{\text{chamaephytes}} \text{ and } \theta_{\text{phanerophytes}} > \theta_{\text{therophytes}} \text{ and } \theta_{\text{geophytes}}$	Chamaephytes and phanerophytes lack conspicuous resistance strategies to cope with water deficits in dry seasons more intense. In contrast, therophytes have an escape strategy through seed banks, while geophytes have an avoidance strategy with underground water-storing organs. Consequently, therophytes and geophytes would be favored under more severe environments with dry seasons more intense.
P3: Resprouting perennial strategies, i.e., geophytes, or disturbance-scaped strategies, i.e., therophytes, have their adaptive optima in niches with higher fire frequency than chamaephytes and phanerophytes.	For the fire frequency axis: $\theta_{\text{therophytes}} \text{ and } \theta_{\text{geophytes}} > \theta_{\text{chamaephytes}} \text{ and } \theta_{\text{phanerophytes}}$	Geophytes have a large underground storage organ with multiple buds that allow them to resprout after fire events and keep the plant alive during the dry season. Therophytes produce an extensive seed bank that can massively germinate and maintain populations under high fire-frequency habitats. Thus, therophytes (scape strategy) and geophytes (avoidance strategy) would be selectively favoured in environments with high fire frequency.

Results

Niche modelling and niche evolution

Overall, environmental niche models had a good predictive performance, with AUC values ranging from 0.81 to 1. Six species had models based on a few occurrences ($3 < n < 10$), with the AUC ranging from 0.83 (*C. anceps* and *C. ulmea*) to 1 (*C. lagotois*). These species also attained significance under the evaluation proposed by (Pearson *et al.*, 2007), having good predictive performance. Seventeen species had between 10 and 30 occurrence points, and the AUC of these models ranged from 0.91 (*C. pilosa*) to 0.99 (*C. confertifomis* and *C. simplifacta*). Finally, 18 species had more than 30 occurrence points, and the AUC of these models ranged from 0.86 (*C. dipylla*) to 0.99 (*C. potentilla*). The table with the model performance for each species is available at Supporting Information Methods S1.

After excluding the three species with insufficient occurrences for niche modelling, our sample maintained 41 taxa representing 38 species and three varieties. The ARC analysis did not support a relationship between species' divergence time and the D and I niche overlap metrics, D ($f=0.50$; $p=0.99$) and I ($f=0.47$; $p=0.94$) (Supporting Information Figure S1, Table S2), indicating that closely related species do not occupy more equal or similar environmental niches than those more distantly related. The ARC analyses based on unique dimensions of the environmental niche also did not support a relationship between species' divergence time and niche overlap metrics (Supporting Information Figure S2, Table S2). Thus, we have evidence that the environmental niche is not conserved over time in this plant lineage.

The evolution of plant life forms

The model assuming equal transition rates among all plant life forms, ER, best fit our data (Supporting Information Table S3) and was used to reconstruct ancestral states in our sample of phylogenetic trees. ER-based SIMMAP analyses indicated conflicting different plant life forms for the last common ancestor of the *Chamaecrista* lineage, although the phanerophyte life form had been the most likely ancestral state inferred in 26.25% of the 2,000 trees of the posterior distribution (Figure 2). Transitions among plant life forms were overall common, with an average of 25 (sd = 4.75) transitions throughout phylogenetic trees. The most common transition was from the phanerophyte to the chamaephyte state (mean 2.43 sd = 1.44), while the least common transition was from the chamaephyte to the geophyte state (mean = 1.70, sd = 1.40).

The geophyte life form evolved independently in clades A, B, and C, but the geophyte life form remained conserved in clade A. On the other hand, all other life forms evolved in clade B, which held the greatest number of transitions among life forms (Figure 2).

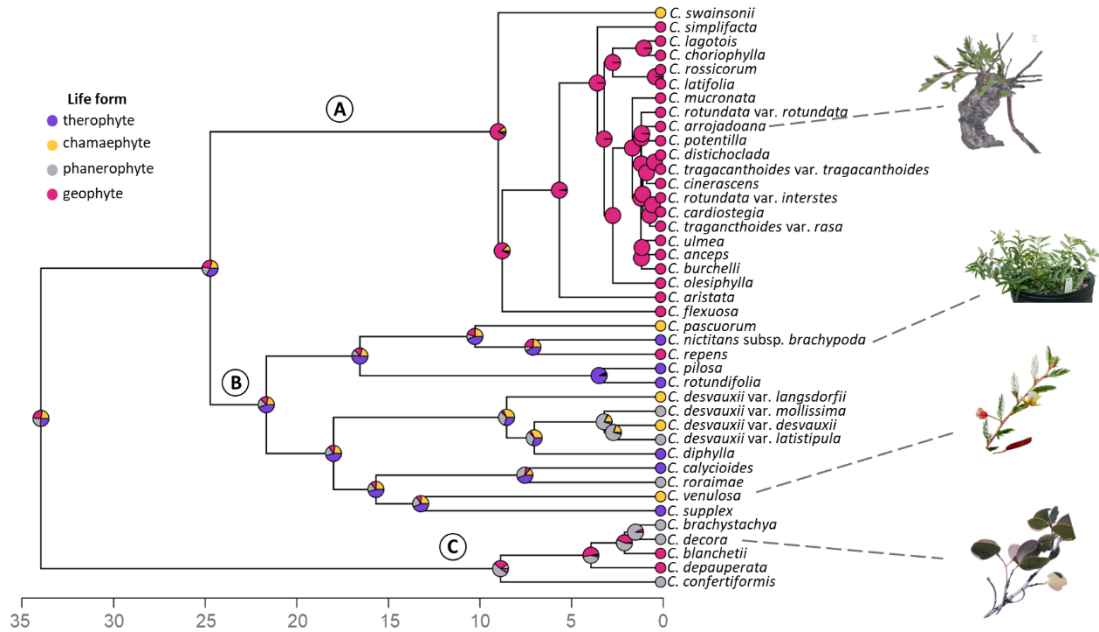


Figure 2: Ancestral reconstruction of plant life forms in the focal *Chamaecrista* lineage. Ancestral state estimates are based on a summary of 2000 SIMMAP trees.

The relationships between the evolution of life forms and environmental niches

OU-based models considering the four different life forms had the best fit for 3 of 4 environmental niche dimensions across the alternative SIMMAP reconstructions (Supporting Information Table S4). The OUM model had the best fit for water availability dimension in the warmest period (bio18) and soil nitrogen dimension, and the OUMV model had the best fit for the fire frequency dimension. In contrast, the WN model (null model) had the best fit for the water niche dimension in the driest period (bio17) (Table 3). Except for the water niche dimension in the driest period (bio17), each plant life form was associated with a distinct evolutionary optimum (θ) of environmental niches. Evolutionary rates (σ^2) and optimum-attraction forces (α) did not differ among plant life forms for two niche dimensions (water availability in the warmest period and nitrogen). For the fire frequency dimension, the evolutionary rates (σ^2) differed among life forms.

The estimated evolutionary optima for therophytes displayed lower water availability and lower soil nitrogen availability than that estimated for all categories of perennial plants (Figures 3a, b, c, d). The perennial life forms were associated with almost twice the water availability of the annual plants. Perennial plants also displayed optima with greater nitrogen availability than annual plants (ca. 1.25x). Among the perennial plants, geophytes had the highest optima values for water availability (bio18) and soil nitrogen concentration (Figures 3a, c).

Plant life forms also had distinct evolutionary optima for the fire frequency dimension. Therophytes and geophytes were associated with higher fire frequencies than chamaephytes and phanerophytes (Figure 3d, e). Therophytes and geophytes occupy niches with 1.8 times and 2.5 times higher fire frequency values than chamaephytes and phanerophytes. Additionally, the rate of evolution of the fire frequency niche dimension was higher in therophytes and geophytes than in the chamaephytes and phanerophytes (Table 3).

Table 3: The four environmental niche axes and their respective best-fit evolutionary models and estimated parameters. Bio18 and Bio17 correspond to water availability in the warmest and driest quarters. Nitrogen corresponds to soil nitrogen availability, and fire corresponds to fire frequency in the environment. Together, these axes represent resources and disturbance gradients. Our results show that with the exception of the bio17 axis, all life forms evolved different adaptive optima along the environmental niche gradient.

Environmental niche axes	Best-fit model	Percentage (%) of phylogenetic trees supporting the best-fit model	Evolutionary parameter estimates			
			Plant life forms	θ	σ^2	α
bio18	OUM	37.6	therophyte	188.8	0.14	0.72
			chamaephyte	318.5	0.14	0.72
			phanerophyte	353.7	0.14	0.72
			geophyte	447.0	0.14	0.72
nitrogen	OUM	51.2	therophyte	136.8	0.55	11.84
			chamaephyte	163.8	0.55	11.84
			phanerophyte	168.4	0.55	11.84
			geophyte	181.5	0.55	11.84
bio17	WT	85.1	therophyte	-	-	-

fire	OUMV	77.0	chamaephyte	-	-	-
			phanerophyte	-	-	-
			geophyte	-	-	-
			therophyte	0.022	0.00014	1.004
			chamaephyte	0.011	0.00009	1.004
			phanerophyte	0.014	0.00006	1.004
			geophyte	0.031	0.00116	1.004

Note: The reported percentage (%) represents the phylogenetic trees supporting the best-fit model, excluding ties. The evolutionary parameter estimates is the median value among the best-fit models. The best-fit model is determined based on the lowest $\Delta AICc$ value, with a lower value indicating a more favorable fit.

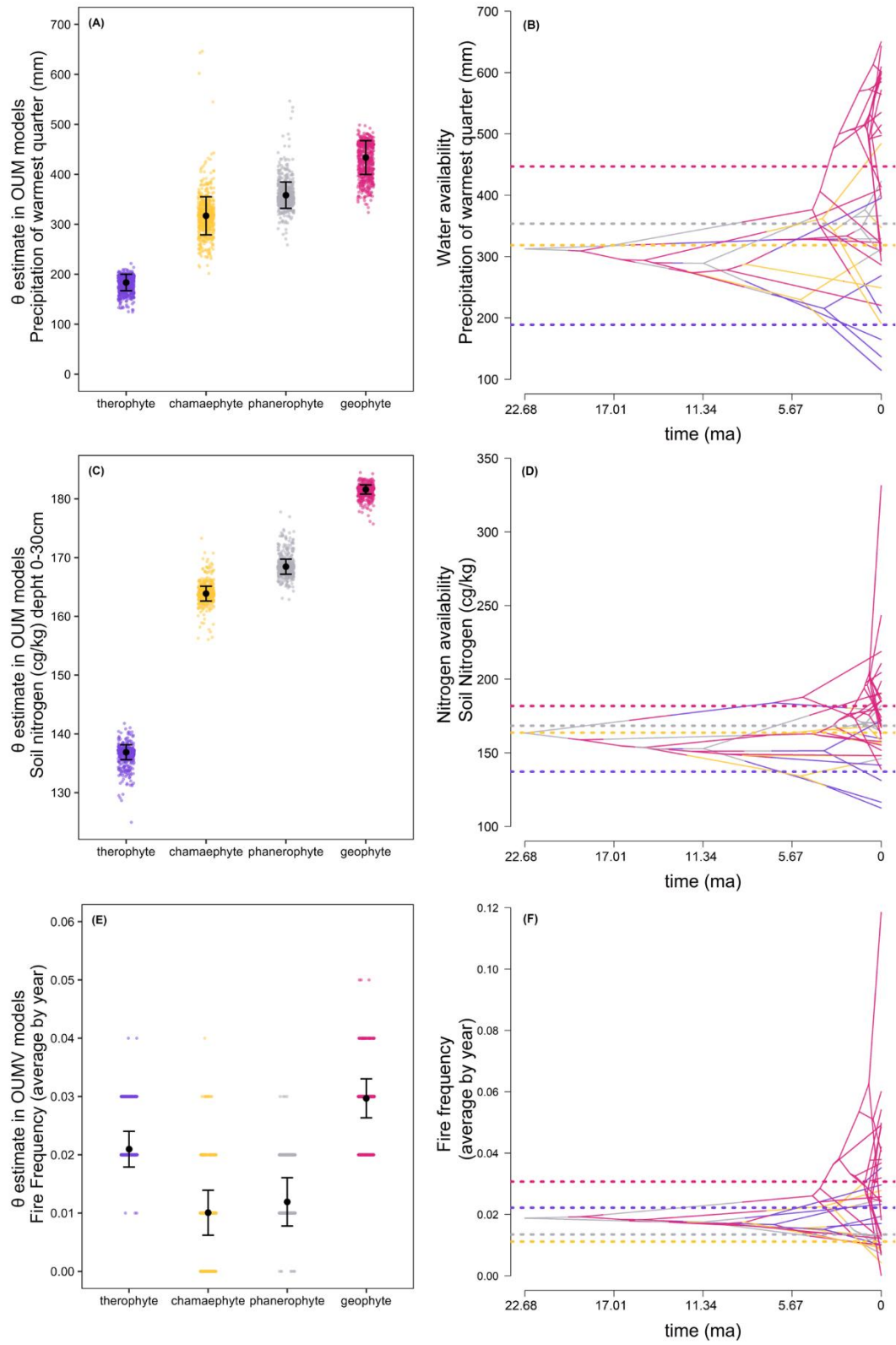


Figure 3: Adaptive optima (θ) estimated in each niche dimension in which evolutionary models were selected as the best fit and the traitgram with a life form mapped joint the current niche. a: The optima (θ) estimated by the OUM model for the bio18 dimension; b: The traitgram with species position along the water availability gradient; c: The optima (θ) estimated by the OUM model for the nitrogen availability dimension; d: The traitgram with species position along the soil nitrogen availability gradient; e: The optima (θ) estimated by the OUMV model for the fire frequency dimension; f: The traitgram with species position along the fire frequency gradient. Colours represent each life form: purple: therophytes, yellow: chamaephytes, grey: phanerophytes and pink: geophytes. In graphs A, C and E, each dot corresponds to the theta value estimated by each model considered the best, excluding ties and the error bars correspond to standard deviation. The dashed line in graphs b, d and f corresponds to theta mean value for each life form.

Discussion

We characterized the environmental niche of 41 taxa in the *Chamaecrista* phylogeny distributed over South America. We applied evolutionary models to investigate whether the evolution of plant life forms occurs with changes in four environmental dimensions of the species' s niche representing resources and disturbance gradients for plants. The environmental niche is not conserved over time in the genus *Chamaecrista*. Instead, species' niches have evolved contrary to the expectations of niche conservatism, and the evolution of plant life forms was correlated with distinct optima in three environmental niche dimensions. More specifically, the evolution of geophytes was associated with higher water and nitrogen availability and higher fire frequency. On the other hand, the evolution of therophytes was associated with lower water and nitrogen availability and intermediate fire frequency. These patterns support our first and third predictions but not our second predictions.

Although niche conservatism is common in many plant lineages (Liu *et al.*, 2020), *Chamaecrista* species had a non-conserved niche evolution in the last 30 million years with descendant lineages occupying distinct environmental conditions from those of ancestor lineages (Warren *et al.*, 2008). This evolutionary pattern depends on 1) the new habitat availability and 2) species' potential to diverge ecologically (Edwards & Donoghue, 2013). In the Neotropics, the relative availability of new habitats during *Chamaecrista* diversification correlates with

geological and climatic processes in the last 30 million years (Lavina & Fauth, 2016). These processes, including Andean uplift and the Open Diagonal formation accentuated by Quaternary cycles, shaped the Neotropical region (Antonelli & Sanmartín, 2011; Lavina & Fauth, 2016). These newly available habitats likely imposed distinct selective pressures on plant lineages, influencing the evolution of life forms. Similar patterns in other Neotropical plant lineages, like *Mimosa* and *Andira*, show life form evolution in response to environmental changes, with resprouting life forms evolving under increased fire frequency during the open diagonal formation (Simon *et al.*, 2009). In *Lupinus* (Fabaceae), annual life forms are associated with the occupation of low-altitude xeric environments (Drummond, 2008), or in *Leucadendron* (Proteaceae), where resprouting life forms had their adaptive optima in high fire frequency habitats (Tonnabel *et al.*, 2018). Accordingly, our study demonstrates the concurrent evolution of *Chamaecrista*'s environmental niches and plant life forms, leading to a correlated pattern between life forms aligning with the newly available environmental conditions.

Plant life forms differ regarding biomass allocation and, therefore, become selectively advantageous in different environments. Supporting our first prediction, annual plants had their adaptive optimum towards low water and nitrogen availability, while perennials, mostly geophytes, had their adaptive optimum towards high water and nitrogen availability. This pattern might reflect distinct selective pressure favouring different plant life forms in each environment. Scarcity of water and nitrogen constrains photosynthetic rates and carbon assimilation (Damatta *et al.*, 2002), impacting biomass allocation among plant organs (Dovrat *et al.*, 2019), especially in perennial plants with substantial height investment. On the other hand, annual plants produce less biomass than perennials and can grow and reproduce when water and nutrients are scarcer, allocating their biomass primarily to reproductive effort, completing their life cycle during short periods of resource availability (Friedman, 2020). This high reproductive input leads to annuals setting great seed banks for future favourable seasons, thus enduring and becoming selectively favoured in environments with low resource availability (Dovrat *et al.*, 2019). Yet, our results suggest that environments with high availability of resources must favour perennial plant species with an investment in height (aboveground organs) that outcompete annual ones. These perennial species have a competitive advantage over annual species due to the higher and steady investment in growth height throughout the whole year, negatively affecting the occurrence of annual species by limiting light and resources needed for seed germination and seedling

development (Tilman, 1988; Rees & Long, 1992). Therefore, the non-occurrence of annual species in environments with high resource availability and few disturbance events would be related to a competitive disadvantage of annual species in relation to perennial species, as observed in some systems (Tilman, 1988; Rees & Long, 1992).

It is also interesting to note that among the perennial life forms, the geophyte is the life form that has an optimal niche with higher water and nutrient availability. For these plants, a high availability of resources might be necessary to develop and maintain underground storage organs. In the case of *Chamaecrista* species, the geophyte plants mainly inhabit the Cerrado and *Campos Rupestres* (Figure 1). Both regions are marked by seasonally dry periods and disturbance events. Thus, our results suggest that the maintenance and survival of the geophyte species in these environments depend on a period of the year when water and nutrient availability is high.

Intense dry seasons in central regions of South America can impose water deficits for plants, limiting species distribution. Unlike therophytes and geophytes, chamaephytes and phanerophytes lack conspicuous escape or avoidance strategies to cope with extreme dry seasons, such as a persistent seed bank or resource-storing organs. Our second prediction stated that chamaephytes and phanerophytes would have evolved niches characterized by dry seasons less intense. However, none of the tested evolutionary models was selected as the best for the water niche dimension in the driest period (bio17). Therefore, neither the phylogenetic pattern nor the plant life forms explain the evolution of species along the water gradient during dry seasons. Although the null model has a better fit to the data, the average range for the accumulated water in the driest period currently inhabited by *Chamaecrista* species corresponds to a small fraction (12.7 to 78.7 mm) of the total variation available in South America, which ranges from 0 to 1631 mm. A similar pattern was found for some Mimosoids lineages (Ringelberg *et al.*, 2023). This result highlights that the perennial *Chamaecrista* species studied here, independent of the life form, probably have some resistance strategy to deal with the intense water restriction during the dry seasons (Bandurska, 2022). Resistance strategies such as avoidance or tolerance often derive from the evolution of ecophysiological and cellular traits, such as thick tissue formation and osmotic adjustment or substances and proteins production, respectively, which protects against the negative effect of osmotic and ionic stresses (Micco & Aronne, 2012; Bandurska, 2022). In both cases, these mechanisms are undetectable under our

life form classification. Furthermore, the focal *Chamaecrista* lineage diversified during the open diagonal formation in South America, probably descending from an ancestor inhabiting tropical rainforests (Conceição *et al.*, 2009). The open diagonal includes highly seasonal environments where dry seasons are more severe than those of adjacent tropical rainforests. Thus, the occurrence of species in an environment marked by very restricted precipitation in the driest period requires, regardless of the plant life form, that the species have some resistance strategies to survive during dry seasons.

Supporting our third prediction, geophytes and therophytes have higher optima values for fire frequency than non-resprouting perennials. Interestingly, our results also show that geophytes present higher optima values for fire frequency than therophytes. Under high fire frequency, therophytes would be disadvantaged because frequent fires can compromise the life cycle of these plants, preventing viable seed bank settings (Enright *et al.*, 2014). On the other hand, in the same scenario, geophytes may be selectively favoured because their underground woody system with root buds facilitates regeneration and regrowth after fire events (Pausas *et al.*, 2018). The resprouting of geophytes can reduce the risk of immaturity, e.g., the risk of dying before seed production (Iwasa & Kubo, 1997; Ojeda *et al.*, 2005) since geophytes persist after the passage of fire, unlike therophytes plants. Furthermore, geophytes can grow faster and blossom earlier after fire events than plants emerging from the seed bank (Iwasa & Kubo, 1997; Lamont *et al.*, 2011; Pausas & Keeley, 2014). This feature increases its competitive advantage over not resprouting species. On the other hand, under lower fire frequency, that is, a larger interval between one fire to another, therophytes producing many seeds have advantages over species that do not produce seeds quickly (Pausas & Keeley, 2014). The short-lived of therophytes allows them to withstand fire disturbance via a persistent seed bank capable of germinating after fire passage (Pausas & Keeley, 2014). Thus, our results support the idea that geophytes and therophytes would better fit different fire regimes (Keeley *et al.*, 2011) and albeit fire-tolerant, in which therophytes would be selectively favoured under intermediate fire frequencies (Enright *et al.*, 2014).

Unexpectedly, given our prediction, we found that environments with low resource availability and high disturbance are less occupied, representing a restrictive ecological condition for the *Chamaecrista* lineage. Illustrating it, geophyte plants had adaptive optima towards the highest fire frequency and high resource availability, while therophyte plants had their adaptive optima towards intermediate fire frequency and the lowest resource availability. It corroborates

plant strategy theory that predicts habitats with low resource availability and high disturbance rates would be unsuitable for all plant strategies because severe stress would prevent plant biomass recovery after disturbance events (Grime, 1977). A similar evolutionary pattern was recorded in a clade of Montiaceae, in which the evolution of succulent leaves, e.g., leaves with higher saturated water content (SWC), is associated with environments with greater resource availability (i.e. greater precipitation) and higher temperatures (i.e. potentially more stressful environments for plants) in relation to species that have lower SWC values (Ogburn and Edwards 2015). Both succulent leaves of Montiaceae and the xylopodia of some *Chamaecrista* species (geophytes) are resource-storing organs that likely become selectively favourable in more intense seasonal environments marked by subsequent high and low resource availability periods. Thus, our study provides more empirical evidence that resource-storing organs are essential for species maintenance in disturbed and seasonal environments.

In sum, our results show that in a *Chamaecrista* lineage, annual species have evolved with environmental niches marked by lower resource availability and intermediate disturbance frequency, while geophyte species have evolved with environmental niches marked by high resource availability and high disturbance frequency. These results show a *trade-off* likely restricts simultaneous plant adaptation to environmental niches with low resource availability and high disturbance. Although we could not distinguish between adaptation and exaptation scenarios, our findings indicate that different plant life forms and environmental niches evolve together. Our results also provide empirical evidence that niche evolution can occur at finer scales, along microhabitats, without necessarily involving a shift to different phytogeographic domains or biomes. Still, the niche change also depends on the evolution of plant functional traits. These findings may have important implications for understanding the environmental factors shaping plant evolution in the Neotropics. They could potentially inform why species occur in specific regions and not in others. From a future perspective, our results also help to understand how future environmental changes may affect plant form and function diversity.

Acknowledgements

We thank the colleagues from LIPA – *Laboratório de Interações Planta-Animal* – for feedback and discussions during the development of this manuscript. Anonymous reviewers provided helpful comments on previous versions of this manuscript. This work is part of the

doctoral thesis of LSP. This work was funded by a fellowship to LSP from the São Paulo Research Foundation (FAPESP/grant number 2021/01573) and by research grants to AN of the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/grant number 434692/2018-2) and the São Paulo Research Foundation through a Young Investigators Grant (FAPESP/grant number 2019/19544-7). SA was supported by Instituto Serrapilheira (grant number 1709-21213). JGR was supported by FAPESB (process JCB0030/2016). RCP was supported by FAPESP (2019/18627-6, 2018/02191-1 and 2019/19544-7).

Competing interests

None declared.

Author contributions

LSP, SA and AN conceived the idea and designed the study. AN provided funding for the study. LSP, RCP, and JGR collected and organized the datasets. LSP conducted the analyses and led the writing of the manuscript. LPS, SA, TV and AN reviewed the drafts of the manuscript. LSP, SA, AN, TV, RCP and JGR contributed to the final version of the manuscript.

Data availability

All our data and R scripts are available on the platform github.com at:
<https://github.com/luanaprochazka/plant-life-form-and-niche-evolution>.

References

- Ackerly DD, Schwilk DW, Webb CO. 2006.** Niche evolution and adaptive radiation: Testing the order of trait divergence. *Ecology* **87**: S50–S61.
- Ahmadi M, Hemami MR, Kaboli M, Shabani F. 2023.** MaxEnt brings comparable results when the input data are being completed; Model parameterization of four species distribution models. *Ecology and Evolution* **13**: 1–13.
- Alencar LRV de, Martins M, Burin G, Quental TB. 2017.** Arboreality constrains morphological evolution but not species diversification in vipers. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences* **284**.

- Antonelli A, Sanmartín I. 2011.** Why are there so many plant species in the Neotropics? *Taxon* **60**: 403–414.
- Baker-Méio B, Marquis RJ. 2012.** Context-dependent benefits from ant-plant mutualism in three sympatric varieties of *Chamaecrista desvauxii*. *Journal of Ecology* **100**: 242–252.
- Bandurska H. 2022.** Drought Stress Responses: Coping Strategy and Resistance. *Plants* **11**: 1–17.
- Beaulieu JM, Jhwueng DC, Boettiger C, O’Meara BC. 2012.** Modeling stabilizing selection: Expanding the Ornstein-Uhlenbeck model of adaptive evolution. *Evolution* **66**: 2369–2383.
- Bellingham PJ, Sparrow AD. 2000.** Resprouting as a life history strategy in woody plant communities. *Oikos* **89**: 409–416.
- BFG, Gomes-da-Silva J, Filardi FLR, Barbosa MR V., Baumgratz JFA, Bicudo CEM, Cavalcanti TB, Coelho MAN, Costa AF, Costa DP, et al. 2022.** Brazilian Flora 2020: Leveraging the power of a collaborative scientific network. *Taxon* **71**: 178–198.
- BFG, Ranzato Filardi FL, De Barros F, Baumgratz JFA, Bicudo CEM, Cavalcanti TB, Nadruz Coelho MA, Costa AF, Costa DP, Goldenberg R, et al. 2018.** Brazilian flora 2020: Innovation and collaboration to meet target 1 of the global strategy for plant conservation (GSPC). *Rodriguesia* **69**: 1513–1527.
- Bollback JP. 2006.** SIMMAP: Stochastic character mapping of discrete traits on phylogenies. *BMC Bioinformatics* **7**.
- Boyko JD, Hagen ER, Beaulieu JM, Vasconcelos T. 2023.** The evolutionary responses of life-history strategies to climatic variability in flowering plants. *New Phytologist*: 1–14.
- Boyko JD, Beaulieu, JM. 2021.** Generalized hidden Markov models for phylogenetic comparative datasets. *Methods in Ecology and Evolution*. **12**:468-478.
- Burnham K, Anderson DR. 2002.** *Model selection and multimodel inference a practical information theoretic approach*.
- Chapman RR, Crow GE. 1981.** Application of Raunkiaer’s Life form System to Plant Species Survival After Fire. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* **108**: 472–478.
- Colli-Silva M, Vasconcelos TNC, Pirani JR. 2019.** Outstanding plant endemism levels strongly support the recognition of campo rupestre provinces in mountaintops of eastern South America. *Journal of Biogeography*: 1–11.

- Conceição A de S, Queiroz LP de, Lewis GP, Andrade MJG de, Almeida PRM de, Schnadelbach AS, van den Berg C. 2009.** Phylogeny of Chamaecrista Moench (Leguminosae-Caesalpinioideae) based on nuclear and chloroplast DNA regions. *Taxon* **58**: 1168–1180.
- Cooper N, Thomas GH, FitzJohn RG. 2016.** Shedding light on the ‘dark side’ of phylogenetic comparative methods. *Methods in Ecology and Evolution* **7**: 693–699.
- Crisp MD, Cook LG. 2012.** Phylogenetic niche conservatism: What are the underlying evolutionary and ecological causes? *New Phytologist* **196**: 681–694.
- Damatta FM, Loos RA, Silva EA, Loureiro ME. 2002.** Limitations to photosynthesis in *Coffea canephora* as a result of nitrogen and water availability. *Journal of Plant Physiology* **159**: 975–981.
- Díaz S, Kattge J, Cornelissen JHC, Wright IJ, Lavorel S, Dray S, Reu B, Kleyer M, Wirth C, Colin Prentice I, *et al.* 2016.** The global spectrum of plant form and function. *Nature* **529**: 167–171.
- Dovrat G, Meron E, Shachak M, Golodets C, Osem Y. 2019.** Plant size is related to biomass partitioning and stress resistance in water-limited annual plant communities. *Journal of Arid Environments* **165**: 1–9.
- Drummond CS. 2008.** Diversification of *Lupinus* (Leguminosae) in the western New World: Derived evolution of perennial life history and colonization of montane habitats. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **48**: 408–421.
- Edwards EJ, Donoghue MJ. 2013.** Is it easy to move and easy to evolve? Evolutionary accessibility and adaptation. *Journal of Experimental Botany* **64**: 4047–4052.
- Elith J, Phillips SJ, Hastie T, Dudík M, Chee YE, Yates CJ. 2011.** A statistical explanation of MaxEnt for ecologists. *Diversity and Distributions* **17**: 43–57.
- Enright NJ, Fontaine JB, Lamont BB, Miller BP, Westcott VC. 2014.** Resistance and resilience to changing climate and fire regime depend on plant functional traits. *Journal of Ecology* **102**: 1572–1581.
- Evans MEK, Hearn DJ, Hahn WJ, Spangle J, Venable D. Lawrence. 2005.** Climate and life-history evolution in evening Primroses (*Oenothera*, *Onagraceae*): a phylogenetic comparative analysis. *Evolution* **59**: 1914–1927.

- Evans MEK, Smith SA, Flynn RS, Donoghue MJ. 2009.** Climate, niche evolution, and diversification of the ‘bird-cage’ evening primroses (*Oenothera*, sections *Anogra* and *Kleinia*). *The American Naturalist* **173**: 225–240.
- Ewel JJ, Bigelow SW. 1996.** Plant Life-Forms and Tropical Ecosystem Functioning. In: Orians GH, Dirzo R, Cushman JH, eds. Biodiversity and ecosystem processes in tropical forest.
- Fick SE, Hijmans RJ. 2017.** WorldClim 2: new 1-km spatial resolution climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology* **37**: 4302–4315.
- Fitzpatrick BM, Turelli M. 2006.** The geography of mammalian speciation: mixed signals from phylogenies and range maps. *Evolution* **60**: 601–615.
- Friedman J. 2020.** The Evolution of Annual and Perennial Plant Life Histories: Ecological Correlates and Genetic Mechanisms. *The Annual Review of ecology, Evolution and Systematics* **51**: 461–481.
- Gorel AP, Duminil J, Doucet JL, Fayolle A. 2019.** Ecological niche divergence associated with species and populations differentiation in *Erythrophleum* (Fabaceae, Caesalpinioideae). *Plant Ecology and Evolution* **152**: 41–52.
- Grabowski et al. 2023.** A Cautionary Note on “A Cautionary Note on the Use of Ornstein Uhlenbeck Models in Macroevolutionary Studies”. *Systematic Biology*. **72**: 4 955-963
- Grant AG, Kalisz S. 2020.** Do selfing species have greater niche breadth? Support from ecological niche modeling. *Evolution* **74**: 73–88.
- Grime JP. 1977.** Evidence for the Existence of Three Primary Strategies in Plants and Its Relevance to Ecological and Evolutionary Theory. *The American Naturalist* **111**: 1169–1194.
- Guisan A, Thuiller W, Zimmermann NE. 2017.** *Habitat Suitability and Distribution Models with Applications in R*. Cambridge University Press.
- Guisan A, Zimmermann NE. 2000.** *Predictive habitat distribution models in ecology*.
- Hamilton CW, Reichard SH. 1992.** Current Practice in the Use of Subspecies, Variety, and Forma in the Classification of Wild Current practice in the use of subspecies, variety, and forma in the classification of wild plants. *Taxon* **41**: 485–498.
- Harmon LJ. 2018.** *Phylogenetic Comparative Methods Learning from trees*.
- Heibl C, Calenge C. 2018.** *Package ‘phyloclim’*.
- Hughes CE, Pennington RT, Antonelli A. 2013.** Neotropical Plant Evolution: Assembling the Big Picture. *Botanical Journal of the Linnean Society* **171**: 1–18.

- Irl SDH, Obermeier A, Beierkuhnlein C, Steinbauer MJ. 2020.** Climate controls plant life-form patterns on a high-elevation oceanic island. *Journal of Biogeography* **47**: 2261–2273.
- Iwasa Y, Kubo T. 1997.** Optimal size of storage for recovery after unpredictable disturbances. *Evolutionary Ecology* **11**: 41–65.
- Keeley JE, Pausas JG, Rundel PW, Bond WJ, Bradstock RA. 2011.** Fire as an evolutionary pressure shaping plant traits. *Trends in Plant Science* **16**: 406–411.
- Lamont BB, Enright NJ, He T. 2011.** Fitness and evolution of resprouters in relation to fire. *Plant Ecology* **212**: 1945–1957.
- Lavina EL, Fauth G. 2016.** Evolução geológica da América do Sul nos últimos 250 milhões de anos. In: Biogeografia da América do Sul. 3–13.
- Liu H, Ye Q, Wiens JJ. 2020.** Climatic-niche evolution follows similar rules in plants and animals. *Nature Ecology and Evolution* **4**: 753–763.
- Micco V, Aronne G. 2012.** Morpho-Anatomical traits for plant adaptation to drought. In: Aroca R, ed. Plant Responses to drought stress From morphological to molecular features. Springer, 37–58.
- Mitchell N, Carlson JE, Holsinger KE. 2018.** Correlated evolution between climate and suites of traits along a fast–slow continuum in the radiation of Protea. *Ecology and evolution* **8**: 1853–1866.
- Mod HK, Scherrer D, Luoto M, Guisan A. 2016.** What we use is not what we know: environmental predictors in plant distribution models. *Journal of Vegetation Science* **27**: 1308–1322.
- Morrone JJ. 2014.** Biogeographical regionalisation of the Neotropical region. *Zootaxa* **3781**: 1–110.
- Morrone JJ, Escalante T, Rodríguez-Tapia G, Carmona A, Arana M, Mercado-Gómez JD. 2022.** Biogeographic regionalization of the Neotropical region: New map and shapefile. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences* **94**: 1–5.
- Ogburn RM, Edwards EJ. 2015.** Life history lability underlies rapid climate niche evolution in the angiosperm clade Montiaceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **92**: 181–192.
- Ojeda F, Brun FG, Vergara JJ. 2005.** Fire, rain and the selection of seeder and resprouter life-histories in fire-recruiting, woody plants. *New Phytologist* **168**: 155–165.

- O'Meara BC, Ané CC, Sanderson MJ, Wainwright PC. 2006.** Testing for different rates of continuous trait evolution using likelihood. *Evolution* **60**: 922–933.
- Pausas JG, Keeley JE. 2014.** Evolutionary ecology of resprouting and seeding in fire-prone ecosystems. *New Phytologist* **204**: 55–65.
- Pausas JG, Lamont BB, Paula S, Appezzato-da-Glória B, Fidelis A. 2018.** Unearthing belowground bud banks in fire-prone ecosystems. *New Phytologist* **217**: 1435–1448.
- Pearson RG, Raxworthy CJ, Nakamura M, Townsend Peterson A. 2007.** Predicting species distributions from small numbers of occurrence records: A test case using cryptic geckos in Madagascar. *Journal of Biogeography* **34**: 102–117.
- Phillips SJ, Anderson RP, Schapire RE. 2006.** Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling* **190**: 231–259.
- Phillips SJ, Dudík M. 2008.** Modeling of species distributions with Maxent: new extensions and a comprehensive evaluation. *Ecography* **31**: 161–175.
- Poggio L, Sousa L de, Batjes NH, Heuvelink GBM, Kempen B, Ribeiro E, Rossiter D. 2021.** SoilGrids 2.0: producing soil information for the globe with quantified spatial uncertainty. *Soil* **7**: 217–240.
- Rando JG, Zuntini AR, Conceição AS, van den Berg C, Pirani JR, de Queiroz LP. 2016.** Phylogeny of Chamaecrista ser. Coriaceae (Leguminosae) unveils a lineage recently diversified in Brazilian campo Rupestre vegetation. *International Journal of Plant Sciences* **177**: 3–17.
- Rapini A, Ribeiro PL, Lambert S, Pirani JR. 2008.** A flora dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço. *Megadiversidade* **4**: 16–24.
- Raunkiaer C. 1934.** *The Life Forms of Plants and Statistical Plant Geography*. London: Oxford University Press.
- Raven PH, Gereau RE, Phillipson PB, Chatelain C, Jenkins CN, Ulloa CU. 2020.** The distribution of biodiversity richness in the tropics. *Science advances* **6**: 1–5.
- Ray D, Behera MD, Jacob J. 2018.** Evaluating Ecological Niche Models: A Comparison Between Maxent and GARP for Predicting Distribution of Hevea brasiliensis in India. *Proceedings of the National Academy of Sciences India* **88**: 1337–1343.
- Rees M, Long MJ. 1992.** Germination biology and the ecology of annual plants. *The American Naturalist* **139**: 484–508.

- Revell LJ. 2012.** phytools: An R package for phylogenetic comparative biology (and other things). *Methods in Ecology and Evolution* **3**: 217–223.
- Ringelberg JJ, Koenen EJM, Sauter B, Aebli A, Rando JG, Iganci JR, Queiroz LP, Murphy DJ, Gaudeul M, Bruneau A, *et al.* 2023.** Precipitation is the main axis of tropical plant phylogenetic turnover across space and time. *Science advances* **9**: 1–16.
- Schulze ED. 1982.** Plant life form and their carbon, water and nutrient relations. In: Physiological Plant Ecology II. Encyclopedia of plant Physiology.
- Searcy CA, Shaffer HB. 2016.** Do Ecological Niche Models Accurately Identify Climatic Determinants of Species Ranges? *The American Naturalist* **187**: 423–435.
- Shary PA, Sharaya LS, Sidiyakina L V., Saksonov S V. 2020.** Impact of Environmental Factors on the Life-Form Diversity of Grassland Vegetation in the Southern Forest–Steppe. *Russian Journal of Ecology* **51**: 11–19.
- Silva BHP da, Rossatto DR. 2019.** Are underground organs able to store water and nutrients? A study case in non-arboreal species from the Brazilian Cerrado. *Theoretical and Experimental Plant Physiology* **31**: 413–421.
- Silveira FAO, Negreiros D, Barbosa NPU, Buisson E, Carmo FF, Carstensen DW, Conceição AA, Cornelissen TG, Echternacht L, Fernandes GW, *et al.* 2016.** Ecology and evolution of plant diversity in the endangered campo rupestre: a neglected conservation priority. *Plant and Soil* **403**: 129–152.
- Simon MF, Grether R, Queiroz LP, Skema C, Pennington RT, Hughes CE. 2009.** Recent assembly of the Cerrado, a neotropical plant diversity hotspot, by in situ evolution of adaptations to fire. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 20359–20364.
- Souza A de S, Lewis GP, Silva MJ da. 2021.** A new infrageneric classification of the pantropical genus *Chamaecrista* (Fabaceae: Caesalpinioideae) based on a comprehensive molecular phylogenetic analysis and morphology. *Botanical Journal of the Linnean Society* **XX**: 1–46.
- Tilman D. 1988.** *Plant strategies and the dynamics and structure of plant communities.*
- Tonnabel J, Schurr FM, Boucher F, Thuiller W, Renaud J, Douzery EJP, Ronce O. 2018.** Life-history traits evolved jointly with climatic niche and disturbance regime in the genus *Leucadendron* (Proteaceae). *The American Naturalist* **191**: 220–234.

- Vasconcelos TNC, Alcantara S, Andrino CO, Forest F, Reginato M, Simon MF, Pirani JR. 2020.** Fast diversification through a mosaic of evolutionary histories characterizes the endemic flora of ancient Neotropical mountains. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences* **287**.
- Vasconcelos T, Boyko JD, Beaulieu JM. 2021.** Linking mode of seed dispersal and climatic niche evolution in flowering plants. *Journal of Biogeography*: 1–14.
- Warren DL. 2012.** In defense of ‘niche modeling’. *Trends in Ecology and Evolution* **27**: 497–500.
- Warren DL, Glor RE, Turelli M. 2008.** Environmental niche equivalency versus conservatism: Quantitative approaches to niche evolution. *Evolution* **62**: 2868–2883.
- Westoby M, Falster DS, Moles AT, Vesk PA, Wright IJ. 2002.** Plant ecological strategies: Some leading dimensions of variation between species. *Annual Review of Ecology and Systematics* **33**: 125–159.

Supporting Information (brief legends)

- Table S1** Classification of *Chamaecrista* species into plant life forms according to the literature.
- Methods S1** Details on niche modeling procedures.
- Figure S1** Correlation between niche overlap metrics and node age.
- Table S2** Parametric and Monte Carlo regression analyses between niche overlap metrics, D and I, for each environmental axis and the overall environmental niche and divergence time.
- Fig. S2** Correlation between niche overlap metrics and node age in the four niche dimensions.
- Table S3** Evolutionary transition models and their respective AICc average values and inferred transition rates among plant life forms.
- Table S4** The fitting metrics between eight evolutionary models and four niche axes across 2000 SIMMAP reconstruction.

Supporting Information

Article title: Resource Availability and Disturbance Frequency Shape Plant Life Forms in Neotropical Habitats

Authors: Luana S. Prochazka, Suzana Alcantara, Juliana Gastaldello Rando, Thais Vasconcelos, Raquel C. Pizzardo and Anselmo Nogueira

The following Supporting Information is available for this article:

Table S1 Classification of *Chamaecrista* species into plant life forms according to the literature. Species with * are available in the phylogeny.

Species	Plant life form	Reference
* <i>Chamaecrista anceps</i> (Benth.) H.S.Irwin & Barneby	geophyte	1
* <i>Chamaecrista aristata</i> (Benth.) H.S.Irwin & Barneby	geophyte	2
* <i>Chamaecrista arrojadoana</i> (Harms) Rando	geophyte	3
<i>Chamaecrista basifolia</i> (Vogel) H.S.Irwin & Barneby	phanerophyte	4
* <i>Chamaecrista blanchetii</i> (Benth.) Conc., L.P. Queiroz & G.P. Lewis	geophyte	5, 6
* <i>Chamaecrista brachystachya</i> (Benth.) Conc., L.P. Queiroz & G.P. Lewis	phanerophyte	7
* <i>Chamaecrista burchelli</i> (Benth.) H.S.Irwin & Barneby	geophyte	8
* <i>Chamaecrista calycioides</i> (DC. ex Collad.) Greene	therophyte	9
* <i>Chamaecrista cardiostegia</i> H.S.Irwin & Barneby	geophyte	10
* <i>Chamaecrista choriophylla</i> (Vogel) H.S.Irwin & Barneby	geophyte	11
* <i>Chamaecrista cinerascens</i> (Vogel) H.S.Irwin & Barneby	geophyte	12
* <i>Chamaecrista confertifomis</i> (H.S. Irwin & Barneby) Conc., L.P. Queiroz & G.P. Lewis	phanerophyte	6, 13
* <i>Chamaecrista coriacea</i> (Benth.) H.S.Irwin & Barneby	geophyte	6, 14
<i>Chamaecrista cultrifolia</i> (Kunth) Britton & Rose ex Britton & Killip	therophyte	9, 15, 16
* <i>Chamaecrista cytisoides</i> (DC. ex Collad.) H.S.Irwin & Barneby	phanerophyte	17
<i>Chamaecrista debilis</i> (Vogel) H.S.Irwin & Barneby	phanerophyte	18, 19
* <i>Chamaecrista decora</i> (H.S. Irwin & Barneby) Conc., L.P. Queiroz & G.P. Lewis	phanerophyte	20
* <i>Chamaecrista depauperata</i> Conc., L.P. Queiroz & G.P. Lewis	geophyte	21
<i>Chamaecrista desvauxii</i> (Collad.) Killip	therophyte	22, 23
* <i>Chamaecrista diphylla</i> (L.) Greene	therophyte	9
* <i>Chamaecrista distichoclada</i> (Benth.) H.S.Irwin & Barneby	geophyte	24
<i>Chamaecrista duckeana</i> (P.Bezerra & Afr.Fern.) H.S.Irwin & Barneby	therophyte	25, 26
* <i>Chamaecrista flexuosa</i> (L.) Greene	geophyte	27
<i>Chamaecrista glandulosa</i> (L.) Greene	chamaephyte	28, 29
<i>Chamaecrista gonoclada</i> (Benth.) H.S.Irwin & Barneby	geophyte	30
<i>Chamaecrista kunthiana</i> (Schltdl. & Cham.) H.S.Irwin & Barneby	therophyte	28
* <i>Chamaecrista lagotois</i> H.S.Irwin & Barneby	geophyte	31
* <i>Chamaecrista latifolia</i> (Benth.) Rando	geophyte	32
* <i>Chamaecrista desvauxii</i> var. <i>latistipula</i> (Benth.) G.P. Lewis	phanerophyte	33
* <i>Chamaecrista mucronata</i> (Spreng.) H.S.Irwin & Barneby	geophyte	34
<i>Chamaecrista multinervia</i> (Mart. ex Benth.) H.S.Irwin & Barneby	geophyte	35
* <i>Chamaecrista nictitans</i> (L.) Moench	therophyte	36

<i>*Chamaecrista olesiphylla</i> (Vogel) H.S.Irwin & Barneby	geophyte	37
<i>Chamaecrista oligandra</i> M.J. Silva & A.O. Souza	geophyte	38
<i>Chamaecrista parvistipula</i> (Benth.) H.S.Irwin & Barneby	geophyte	39
<i>*Chamaecrista pascuorum</i> (Benth.) H.S.Irwin & Barneby	chamaephyte	40, 41, 42
<i>*Chamaecrista pilosa</i> (L.) Greene	therophyte	9
<i>*Chamaecrista potentilla</i> (Mart. ex Benth.) H.S.Irwin & Barneby	geophyte	43
<i>Chamaecrista ramosa</i> (Vogel) H.S.Irwin & Barneby	chamaephyte	9, 44
<i>*Chamaecrista repens</i> (Vogel) H.S.Irwin & Barneby	geophyte	45, 46, 47
<i>*Chamaecrista roraimae</i> (Benth.) Gleason	phanerophyte	48
<i>*Chamaecrista rossicorum</i> (H.S. Irwin & Barneby) Rando	geophyte	49
<i>*Chamaecrista rotundata</i> (Vogel) H.S.Irwin & Barneby	geophyte	50
<i>*Chamaecrista rotundifolia</i> (Pers.) Greene	therophyte	9
<i>Chamaecrista rufa</i> (M.Martens & Galeotti) Britton & Rose	phanerophyte	51, 52
<i>Chamaecrista serpens</i> (L.) Greene	therophyte	9
<i>*Chamaecrista simplifolia</i> H.S.Irwin & Barneby	geophyte	53
<i>*Chamaecrista supplex</i> (Mart. ex Benth.) Britton & Rose ex Britton & Killip	therophyte	9
<i>*Chamaecrista swainsonii</i> (Benth.) H.S.Irwin & Barneby	chamaephyte	46, 54, 55
<i>Chamaecrista tenuisepala</i> (Benth.) H.S.Irwin & Barneby	chamaephyte	56, 57, 58
<i>*Chamaecrista tragacanthoides</i> (Mart. ex Benth.) H.S.Irwin & Barneby	geophyte	59
<i>Chamaecrista trichopoda</i> (Benth.) Britton & Rose ex Britton & Killip	chamaephyte	60, 61
<i>*Chamaecrista ulmea</i> H.S.Irwin & Barneby	geophyte	62
<i>*Chamaecrista unijuga</i> (Benth.) Conc., L.P. Queiroz & G.P. Lewis	phanerophyte	63
<i>*Chamaecrista venulosa</i> (Benth.) H.S.Irwin & Barneby	chamaephyte	64, 65
<i>*Chamaecrista desvauxii</i> var. <i>langsdoerffii</i> (Kunth ex Vogel) H.S.Irwin & Barneby	chamaephyte	66
<i>*Chamaecrista desvauxii</i> var. <i>molissima</i> (Benth.) H.S.Irwin & Barneby	phanerophyte	66
<i>*Chamaecrista desvauxii</i> var. <i>desvauxii</i> (Collad.) Killip	chamaephyte	67

References

1. Rando, J.G.; Cota, M.M.T.; Conceição, A.S.; Barbosa, A.R.; Barros, T.L.A. 2020. *Chamaecrista* in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB27840>>. Acesso em: 17 dez. 2021
2. Rando, J.G.; Cota, M.M.T.; Conceição, A.S.; Barbosa, A.R.; Barros, T.L.A. 2020. *Chamaecrista* in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB27845>>. Acesso em: 17 dez. 2021

3. Rando, J.G.; Cota, M.M.T.; Conceição, A.S.; Barbosa, A.R.; Barros, T.L.A. 2020. Chamaecrista in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB606855>>. Acesso em: 17 dez. 2021
4. Zeferino, L.C.; Queiroz, R.T.; Rando, J.G.; Cota, M.M.T.; Fantini, I.F.; Caetano, A.P.S.; Perez, A.P.F. 2019. The genus Chamaecrista (Leguminosae: Caesalpinioideae) in Parque Estadual do Rio Preto, São Gonçalo do Rio Preto, Minas Gerais, Brazil. Rodriguésia 70: e02802017. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rod/a/fPrMBLxjSBPmVsH9jG9FCGt/?format=pdf&lang=pt>>. Acesso em: 17 dez. 2021
5. Rando, J.G.; Cota, M.M.T.; Conceição, A.S.; Barbosa, A.R.; Barros, T.L.A. 2020. Chamaecrista in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB105505>>. Acesso em: 17 dez. 2021
6. Conceição, A.S. 2006. Filogenia do gênero Chamaecrista (Leguminosae - Caesalpinioideae) e taxonomia do grupo Baseophyllum. 2006. Tese (Doutorado) - Pós Graduação em Botânica, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia.
7. Rando, J.G.; Cota, M.M.T.; Conceição, A.S.; Barbosa, A.R.; Barros, T.L.A. 2020. Chamaecrista in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB105506>>. Acesso em: 17 dez. 2021
8. Rando, J.G.; Cota, M.M.T.; Conceição, A.S.; Barbosa, A.R.; Barros, T.L.A. 2020. Chamaecrista in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB27863>>. Acesso em: 17 dez. 2021
9. Queiroz, R.T.; Loiola, M.I. 2009. O gênero Chamaecrista Moench (Caesalpinioideae) em áreas do entorno do Parque Estadual das Dunas de Natal, Rio Grande do Norte, Brasil. Hoehnea 36(4): 725-736. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/hoehnea/a/zF53xsSSbD6cSNwgMrFq89v/?lang=pt&format=pdf>>. Acesso em: 17 dez. 2021
10. Rando, J.G.; Cota, M.M.T.; Conceição, A.S.; Barbosa, A.R.; Barros, T.L.A. 2020. Chamaecrista in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB27870>>. Acesso em: 17 dez. 2021

11. Rando, J.G.; Cota, M.M.T.; Conceição, A.S.; Barbosa, A.R.; Barros, T.L.A. 2020. *Chamaecrista* in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB27884>>. Acesso em: 17 dez. 2021
12. Rando, J.G.; Cota, M.M.T.; Conceição, A.S.; Barbosa, A.R.; Barros, T.L.A. 2020. *Chamaecrista* in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB27890>>. Acesso em: 17 dez. 2021
13. Rando, J.G.; Cota, M.M.T.; Conceição, A.S.; Barbosa, A.R.; Barros, T.L.A. 2020. *Chamaecrista* in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB105462>>. Acesso em: 17 dez. 2021
14. Rando, J.G.; Cota, M.M.T.; Conceição, A.S.; Barbosa, A.R.; Barros, T.L.A. 2020. *Chamaecrista* in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB103778>>. Acesso em: 17 dez. 2021
15. Rando, J.G.; Cota, M.M.T.; Conceição, A.S.; Barbosa, A.R.; Barros, T.L.A. 2020. *Chamaecrista* in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB583308>>. Acesso em: 17 dez. 2021
16. Barbosa, A.R.; Machado, M.C.; Lewis, G.P.; Forest, F. Queiroz, L.P. 2016. Re-establishment of *Chamaecrista cultrifolia* (Leguminosae, Caesalpinioideae) based on morphological and molecular analyses. *Phytotaxa* 265(3):183-203.
17. Rando, J.G.; Cota, M.M.T.; Conceição, A.S.; Barbosa, A.R.; Barros, T.L.A. 2020. *Chamaecrista* in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB27907>>. Acesso em: 17 dez. 2021
18. Rando, J.G.; Cota, M.M.T.; Conceição, A.S.; Barbosa, A.R.; Barros, T.L.A. 2020. *Chamaecrista* in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB27916>>. Acesso em: 17 dez. 2021
19. Nascimento, E.A.; Del-Claro, K. 2010. Ant visitation to extrafloral nectaries decreases herbivory and increases fruit set in *Chamaecrista debilis* (Fabaceae) in a Neotropical savanna. *Flora* 205(11): 711-786.
20. Rando, J.G.; Cota, M.M.T.; Conceição, A.S.; Barbosa, A.R.; Barros, T.L.A. 2020. *Chamaecrista* in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB105507>>. Acesso em: 17 dez. 2021

21. Rando, J.G.; Cota, M.M.T.; Conceição, A.S.; Barbosa, A.R.; Barros, T.L.A. 2020. *Chamaecrista* in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB27922>>. Acesso em: 17 dez. 2021
22. Rando, J.G.; Cota, M.M.T.; Conceição, A.S.; Barbosa, A.R.; Barros, T.L.A. 2020. *Chamaecrista* in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB78639>>. Acesso em: 17 dez. 2021
23. Baker-Méio, B.; Marquis, R.J. 2011 Context-dependent benefits from ant-plant mutualism in three sympatric varieties of *Chamaecrista desvauxii*. *Journal of Ecology*. 100: 242-252.
24. Rando, J.G.; Cota, M.M.T.; Conceição, A.S.; Barbosa, A.R.; Barros, T.L.A. 2020. *Chamaecrista* in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB27938>>. Acesso em: 17 dez. 2021
25. Matos, S.S.; Melo, A.L.; Santos-Silva, J. 2019. *Caesalpinioideae* e *Cercidoideae* (Leguminosae) no Parque Estadual Mata da Pimenteira, Semiárido de Pernambuco, Brasil. *Rodriguesia* 70: e01842017. "
26. Queiroz, R.T. 2011. *Fabaceae - Chamaecrista duckeana* (A. Fernandes & P. Bezerra) Irwin & Barneby. Disponível em: <<http://rubens-plantasdobrasil.blogspot.com/2011/09/chamaecrista-duckeana.html>>. Acesso em 17 dez. 2021.
27. Rando, J.G.; Cota, M.M.T.; Conceição, A.S.; Barbosa, A.R.; Barros, T.L.A. 2020. *Chamaecrista* in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB82900>>. Acesso em: 17 dez. 2021
28. Dantas, M.M.; Silva, M.J. 2013. O gênero *Chamaecrista* (Leguminosae, Caesalpinioideae, Cassieae) no Parque Estadual da Serra Dourada, Goiás, Brasil. *Rodriguésia* 64 (3): 581-595.
29. Rando, J.G.; Cota, M.M.T.; Conceição, A.S.; Barbosa, A.R.; Barros, T.L.A. 2020. *Chamaecrista* in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB82902>>. Acesso em: 17 dez. 2021
30. Rando, J.G.; Cota, M.M.T.; Conceição, A.S.; Barbosa, A.R.; Barros, T.L.A. 2020. *Chamaecrista* in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB27960>>. Acesso em: 17 dez. 2021
31. Rando, J.G.; Cota, M.M.T.; Conceição, A.S.; Barbosa, A.R.; Barros, T.L.A. 2020. *Chamaecrista* in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB27980>>. Acesso em: 17 dez. 2021

32. Rando, J.G.; Cota, M.M.T.; Conceição, A.S.; Barbosa, A.R.; Barros, T.L.A. 2020. Chamaecrista in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB133067>>. Acesso em: 17 dez. 2021
33. Cota, M.M.T. 2016. Estudos em Chamaecrista (Leguminosae) do planalto de Diamantina, Minas Gerais: flora e novidades taxômicas. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
34. Rando, J.G.; Cota, M.M.T.; Conceição, A.S.; Barbosa, A.R.; Barros, T.L.A. 2020. Chamaecrista in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB27997>>. Acesso em: 17 dez. 2021
35. Rando, J.G.; Cota, M.M.T.; Conceição, A.S.; Barbosa, A.R.; Barros, T.L.A. 2020. Chamaecrista in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB27998>>. Acesso em: 17 dez. 2021
36. Ruhren, S. 2003. Seed predators are undeterred by nectar-feeding ants on Chamaecrista nictitans (Caesalpineaceae). Plant Ecology, 166 (2) 189-198.
37. Rando, J.G.; Cota, M.M.T.; Conceição, A.S.; Barbosa, A.R.; Barros, T.L.A. 2020. Chamaecrista in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB28019>>. Acesso em: 18 dez. 2021
38. Rando, J.G.; Cota, M.M.T.; Conceição, A.S.; Barbosa, A.R.; Barros, T.L.A. 2020. Chamaecrista in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB613657>>. Acesso em: 18 dez. 2021
39. Rando, J.G.; Cota, M.M.T.; Conceição, A.S.; Barbosa, A.R.; Barros, T.L.A. 2020. Chamaecrista in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB82917>>. Acesso em: 18 dez. 2021
40. Queiroz, R.T. 2011. Fabaceae - Chamaecrista pascuorum (Benth.) Irwin & Barneby. Disponível em: <<http://rubens-plantasdobrasil.blogspot.com/2011/09/chamaecrista-pascuorum-benthirwin.html>> Acesso em: 18 dez. 2021.
41. Lewis, G.P. 1984. Notas em etiqueta de exsicata. Disponível em <<https://fsi-gc.cria.org.br/fsi/server?type=image&source=herbaria/VIC/VIC045733.jpg&height=1024&format=jpeg>>. Acesso em 18 dez. 2021.

42. Rando, J.G.; Cota, M.M.T.; Conceição, A.S.; Barbosa, A.R.; Barros, T.L.A. 2020. Chamaecrista in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB82918>>. Acesso em: 18 dez. 2021
43. Rando, J.G.; Cota, M.M.T.; Conceição, A.S.; Barbosa, A.R.; Barros, T.L.A. 2020. Chamaecrista in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB28040>>. Acesso em: 18 dez. 2021
44. Rando, J.G.; Cota, M.M.T.; Conceição, A.S.; Barbosa, A.R.; Barros, T.L.A. 2020. Chamaecrista in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB82919>>. Acesso em: 18 dez. 2021
45. Rando, J.G.; Cota, M.M.T.; Conceição, A.S.; Barbosa, A.R.; Barros, T.L.A. 2020. Chamaecrista in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB82923>>. Acesso em: 18 dez. 2021
46. Correia, C.L.S.B.; Conceição, A.D. 2017. The genus Chamaecrista Moench in a fragment of the Ecological Station Raso da Catarina, Bahia, Brazil. Biota Neotropica 17 (2): e20160225.
47. Camargo, R.A.; Miotto, S.T.S. 2004. O gênero Chamaecrista Moench (Leguminosae-Caesalpinioideae) no Rio Grande do Sul. IHERINGIA 59 (2): 131-148.
48. Rando, J.G.; Cota, M.M.T.; Conceição, A.S.; Barbosa, A.R.; Barros, T.L.A. 2020. Chamaecrista in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB28059>>. Acesso em: 18 dez. 2021
49. Rando, J.G.; Cota, M.M.T.; Conceição, A.S.; Barbosa, A.R.; Barros, T.L.A. 2020. Chamaecrista in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB133069>>. Acesso em: 18 dez. 2021
50. Rando, J.G.; Cota, M.M.T.; Conceição, A.S.; Barbosa, A.R.; Barros, T.L.A. 2020. Chamaecrista in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB78645>>. Acesso em: 18 dez. 2021
51. Rando, J.G.; Cota, M.M.T.; Conceição, A.S.; Barbosa, A.R.; Barros, T.L.A. 2020. Chamaecrista in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB82927>>. Acesso em: 18 dez. 2021
52. Flora del Bajío y de regiones adyacentes. 1997. Disponível em: <<http://www1.inacol.edu.mx/publicaciones/resumeness/FLOBA/Flora%2051.pdf>>. Acesso em: 18 dez. 2021.

53. Rando, J.G.; Cota, M.M.T.; Conceição, A.S.; Barbosa, A.R.; Barros, T.L.A. 2020. Chamaecrista in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB78647>>. Acesso em: 18 dez. 2021
54. Rando, J.G.; Cota, M.M.T.; Conceição, A.S.; Barbosa, A.R.; Barros, T.L.A. 2020. Chamaecrista in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB18393>>. Acesso em: 18 dez. 2021
55. Queiroz, R.T. 2010. Fabaceae - Chamaecrista swainsonii (Benth.) H.S. Irwin & Barneby. Disponível em: <<http://rubens-plantasdobrasil.blogspot.com/2010/10/chamaecrista-swainsonii-benth-hsirwin.html>>. Acesso em 18 dez. 2021.
56. Rando, J.G.; Cota, M.M.T.; Conceição, A.S.; Barbosa, A.R.; Barros, T.L.A. 2020. Chamaecrista in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB82934>>. Acesso em: 18 dez. 2021
57. Queiroz, R.T. 2014. Fabaceae - Chamaecrista tenuisepala (Benth.) H.S. Irwin & Barneby. Disponível em: <<http://rubens-plantasdobrasil.blogspot.com/2014/11/fabaceae-chamaecrista-tenuisepala-benth.html>>. Acesso em: 18 dez. 2021.
58. Araújo, F.S. et al. 2011. Floristics and life-forms along a topographic gradient, central-western Ceará, Brazil. *Rodriguésia* 62(2): 341-366.
59. Rando, J.G.; Cota, M.M.T.; Conceição, A.S.; Barbosa, A.R.; Barros, T.L.A. 2020. Chamaecrista in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB28091>>. Acesso em: 18 dez. 2021
60. Rando, J.G.; Cota, M.M.T.; Conceição, A.S.; Barbosa, A.R.; Barros, T.L.A. 2020. Chamaecrista in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB82936>>. Acesso em: 18 dez. 2021
61. Souza, A.O.; Silva, M.J. 2015. Estudo taxonômico do gênero Chamaecrista Moench. (Caesalpinioideae, Leguminosae) na Floresta Nacional de Silvânia, Goiás, Brasil. *IHERINGIA* 70 (1):73-88.
62. Rando, J.G.; Cota, M.M.T.; Conceição, A.S.; Barbosa, A.R.; Barros, T.L.A. 2020. Chamaecrista in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB28095>>. Acesso em: 18 dez. 2021

63. Rando, J.G.; Cota, M.M.T.; Conceição, A.S.; Barbosa, A.R.; Barros, T.L.A. 2020. Chamaecrista in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB105504>>. Acesso em: 18 dez. 2021
64. Rando, J.G.; Cota, M.M.T.; Conceição, A.S.; Barbosa, A.R.; Barros, T.L.A. 2020. Chamaecrista in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB28099>>. Acesso em: 18 dez. 2021
65. Rando, J.G. 2009. Chamaecrista Moench seções Apoucouita, Chamaecrista e Xerocalyx (Leguminosae - "Caesalpinioideae") na Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil. Dissertação (Mestrado). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo.
66. Matos, C.M.J. et al. 2018. Flora das cangas da serra dos Carajás, Pará, Brasil: Leguminosae. Rodriguésia 69(3): 1147-1220
67. Rando, J.G.; Cota, M.M.T.; Conceição, A.S.; Barbosa, A.R.; Barros, T.L.A. Chamaecrista in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Available at: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB27928>>. Accessed on: 29 Mar. 2022

Methods S1 Details on niche modeling procedures

Chamaecrista species' occurrences

Chamaecrista species' occurrences were extracted from three online databases: Global Biodiversity Information Facility (GBIF) (<http://gbif.org>), Re flora Virtual Herbarium (<http://reflora.jbrj.gov.br>), and Environmental Information Reference Center (<http://splink.cria.org.br>). The search in these databases summed up 20,969 records. These databases are redundant to some extent, holding duplicate records. Hence, we first organized species' occurrences into a spreadsheet and removed all duplicate occurrences. Moreover, these online databases hold occurrences with different quality issues. The two major quality issues are taxonomic errors, e.g. incorrect or outdated identification, and low-accuracy or missing geographic coordinates (Meyer et al. 2016). Hence, we applied quality filters to remove occurrences with dubious or missing identification and/or geographic information.

In the first quality filter, we removed the occurrences with unreliable taxonomic identification. We recognized 12 expert researchers with recurrent work on the study group (Table 1), and we considered occurrences with identification by these experts reliable. We highlighted all occurrences without identification by an expert and submitted them to an additional taxonomic identification. If the occurrence was associated with an accurate geographic coordinate and an image in a virtual herbarium, the taxonomic identification of the specimen was checked and confirmed by an expert in the group. Otherwise, the occurrence was removed from our database. After taxonomic-identification cleaning, we removed the occurrences of missing geographic information. After geographic-information cleaning, we plotted all occurrences on Google Earth to check their spatial placement. We highlighted those occurrences whose geographic coordinates and collection localities did not agree, and we reassigned geographic coordinates to collection localities when detailed information was available. We assigned occurrences with missing geographic coordinates to their respective collection localities when detailed information was available. Otherwise, the occurrence was removed from our database. Moreover, we removed those occurrences whose spatial placement was over municipality centroids or over the sea.

We added to our dataset a set of occurrences from the 'examined material' section in taxonomic monographs (Rando 2014; Zeferino et al. 2019). We also added occurrences recorded by our research group that were not available in the virtual herbarium network. Finally, we

checked our dataset for dubious taxonomic identifications. We considered as dubious those identifications which held a history of different taxonomic assignments, such as same-species varieties that were once considered as distinct species or interchanges among varietal names. We checked the associated specimens in the virtual herbarium network for dubious identification occurrences and forwarded them to an expert for identification. When the specimen image was unavailable, we assumed the most recent identification was the most suitable. The initial and final numbers of occurrences per taxa are available in Table 1, while all occurrence sampling and cleaning procedures are described in Figure 1.

Table 1: The total number of occurrences available in online databases and the number of occurrences after cleaning procedures.

Species	Occurrences in online databases	Occurrences without duplicate	Occurrences with reliable identification	Occurrences suitable for niche modeling
<i>C. anceps</i>	13	7	7	4
<i>C. aristata</i>	91	26	24	17
<i>C. arrojadoana</i>	379	206	152	93
<i>C. blanchetti</i>	935	402	246	124
<i>C. brachystachya</i>	674	229	142	56
<i>C. burchelli</i>	66	18	18	14
<i>C. calycioides</i>	609	347	143	21
<i>C. cardiostegia</i>	130	39	32	20
<i>C. choriophylla</i>	255	41	23	11
<i>C. cinearescens</i>	131	61	43	23
<i>C. confertifomis</i>	291	96	72	43
<i>C. coriacea</i>	24	5	4	2
<i>C. cytisoides</i>	734	213	39	5
<i>C. decora</i>	194	65	37	22
<i>C. depauperata</i>	56	13	13	10
<i>C. desvauxii</i> var. <i>desvauxii</i>	478	228	73	29
<i>C. desvauxii</i> var. <i>langsdorfii</i>	862	383	160	60
<i>C. desvauxii</i> var. <i>latistipula</i>	531	257	101	38
<i>C. desvauxii</i> var. <i>molissima</i>	1511	600	261	61
<i>C. diphylla</i>	1707	807	231	56
<i>C. distichoclada</i>	80	21	19	13
<i>C. flexuosa</i> var. <i>flexuosa</i>	1528	724	287	98
<i>C. lagotois</i>	40	18	16	14
<i>C. latifolia</i>	91	86	65	26
<i>C. mucronata</i>	554	256	84	42

<i>C. nictitans</i> subsp. <i>brachypoda</i>	329	136	85	47
<i>C. olesiphylla</i>	327	114	94	59
<i>C. pascuorum</i>	584	224	107	54
<i>C. pilosa</i> var. <i>luxurians</i>	43	26	16	16
<i>C. potentilla</i>	404	114	90	57
<i>C. repens</i> var. <i>multijuga</i>	314	299	174	61
<i>C. roraimae</i>	407	113	76	35
<i>C. rossicorum</i>	101	64	53	31
<i>C. rotundata</i> var. <i>interstes</i>	111	37	33	20
<i>C. rotundata</i> var. <i>rotundatada</i>	167	90	83	43
<i>C. rotundifolia</i> var. <i>grandiflora</i>	575	227	108	50
<i>C. simpliflora</i>	81	26	25	17
<i>C. supplex</i>	490	208	93	36
<i>C. swainsonii</i>	230	119	65	35
<i>C. tragacanthoides</i> var. <i>rasa</i>	112	36	34	18
<i>C. tragacanthoides</i> var. <i>tragacanthoides</i>	71	32	29	25
<i>C. ulmea</i>	39	7	7	6
<i>C. unijuga</i>	51	22	17	4
<i>C. venulosa</i>	245	98	50	30
Total	16645	7140	3531	1546

* Occurrences identified by the following researchers: Barneby, R.C., Bortoluzzi, R.L.C., Conceição, A.S., Cota, M.M.T., Fernandes, A., Guedes, M.L., Irwin, H.S., Lewis, G.P., Queiroz, L.P., Queiroz, R.T., Rando, J.G. e Souza, A.O.

** Occurrences remaining after data cleaning followed by the addition of occurrences from the literature and collections made during our research.

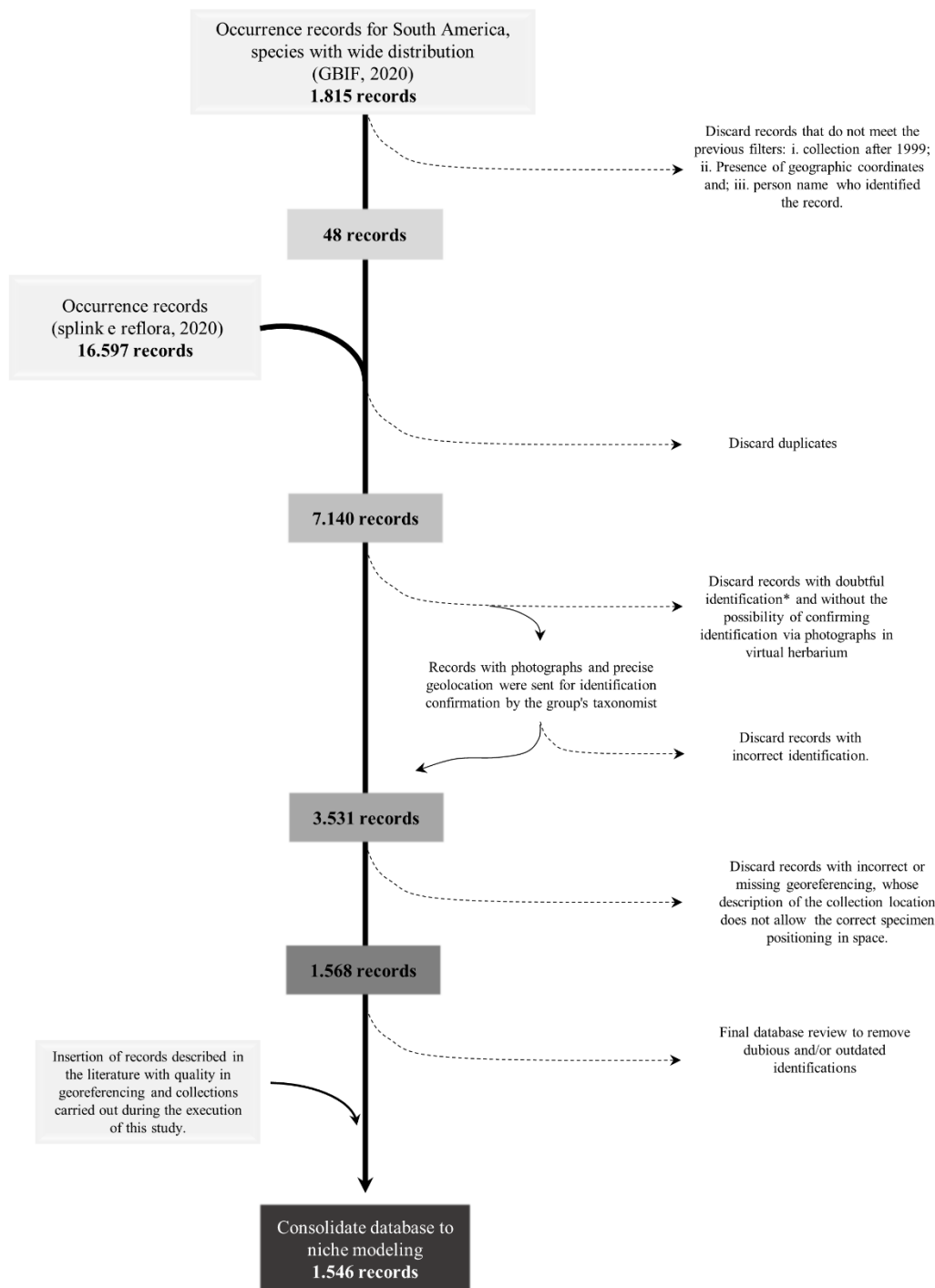


Figure 1: The schematic workflow for cleaning species' occurrences.

Selection of environmental variables for niche modeling

To model the environmental niche of *Chamaecrista* species, we initially selected ten environmental variables representing climatic, edaphic, and disturbance conditions that can potentially impact the fitness and distribution of our study species (Table 2). We consider environmental variables describing resource availability (e.g. water and soil nutrients), metabolic rates (e.g. temperature), and disturbance frequency (e.g. fire frequency) (Guisan and Zimmermann 2000; Mod et al. 2016). Since precipitation values may not approximate water availability for plants in a given site (Mod et al. 2016), we also consider variables describing evapotranspiration potential and topographic moisture. These variables provide more *in locus* measures of water availability because they consider evapotranspiration rates and water runoff along the topographic gradient, likely improving model predictive performance (Mod et al. 2016; Title and Bemmels 2018).

Besides water, another essential resource is soil nutrients and their potential mobility between soil and plant roots (Guisan and Zimmermann 2000; Mod et al. 2016). Since nitrogen is a major nutrient for plant metabolism, determining their photosynthetic potential (Loomis 1997), we included nitrogen availability in the first 30-cm soil profile as a modeling variable.

The frequency of environmental disturbances can also impact plant survival, specifically those damaging plant stem systems (Ewel and Bigelow 1996; Mod et al. 2016). Hence, we also considered the frequency of fires as a modeling variable, a disturbance factor whose intensity greatly varies across the South American landscape.

Table 1: The ten environmental variables utilized for environmental niche modeling of *Chamaecrista* species.

Acronym	Environmental variables	Scale	Reference
Bio4	Temperature Seasonality (standard deviation $\times 100$)	$^{\circ}\text{C}$	(Fick and Hijmans 2017)
Bio17	Precipitation of the driest quarter	mm	(Fick and Hijmans 2017)
Bio18	Precipitation of the warmest quarter	mm	(Fick and Hijmans 2017)
cec	Cation exchange capacity at pH 7 in the first 30-cm soil profile	mmol(c)/kg	(Poggio et al. 2021)

nitrogen	Nitrogen concentration in the first 30- cm soil profile	cg/Kg	(Poggio et al. 2021)
PETdriestQuarter	Average monthly evapotranspiration potential of the driest quarter	mm/month	(Title and Bemmels 2018)
PETSeasonality	Monthly variability of potential evapotranspiration	mm/month	(Title and Bemmels 2018)
PETWarmestQuarter	Average monthly evapotranspiration potential of the warmest quarter	mm/month	(Title and Bemmels 2018)
topoWet	Topographic moisture index	-	(Title and Bemmels 2018)
firefrequency	Average annual fire frequency between 1999 and 2019	fires/year	BD Queimadas – INPE (https://queimadas.dgi.inpe.br)

Environmental niche modeling

The environmental niche modeling was performed using the maximum entropy algorithm (Maxent) 3.4.4 (Phillips et al. 2006; Phillips and Dudík 2008). We considered the previously described environmental variables as model predictors at a 30-second raster resolution ($\sim 1 \text{ km}^2$). We utilized cleaned species' occurrences as 'presence' records. We considered the environmental background as a set of ten thousand points systematically distributed across South America. We only considered the "linear" and "quadratic" features for niche modeling because we had few presence records per species. Three species with less than three presence records were not modeled (Guisan et al. 2017). We modeled each species by allowing only one presence record per grid cell to avoid spatial pseudo-replication (Guisan et al. 2017).

We evaluated model performance by a 10-fold cross-validation. Occurrences were divided into ten mutually-exclusive subsets, and each subset was excluded from model training and later used for model testing over different turns (Elith et al. 2011 - Appendix 4). We applied a Jackknife procedure for species with less than ten occurrences, so the number of replicas was equal to the number of occurrences. We evaluated model performance by the Area Under the Curve (AUC) of the Receiver Operating Characteristic, and we considered the mean values calculated over all replicas as the performance indicator. For species with fewer than ten occurrences, we evaluated model performance by the mean AUC value after the Jackknife randomization technique (Pearson et al. 2007). To apply this technique, we transformed the model probability of presence to binary presence-absence values based on the 'minimum training presence' (MTP) value. The MTP value indicates the minimum suitability value for any presence

used in model training, and it then considers any region with a suitability value equal to or greater than the minimum value as predicted presence (Phillips et al. 2006). We chose the MTP because it is conservative, providing proportionally small areas of predicted presence (Pearson et al. 2007).

Table 2: Chamaecrista species and their respective number of total occurrences, number of occurrences utilized in training and testing environmental niche models, and odds of observed predictive performance resulting from randomness (AUC and p-value). The AUC values correspond to the average calculated over a 10-replica cross-validation procedure. For species with less than ten occurrences, the AUC values correspond to the average calculated over a Jackknife procedure.

Species	Total occurrences	Training subset	Training AUC	Testing subset	Testing AUC	p-value
<i>C. anceps</i>	3	2	0.9999	1	0.8333	2.70E-07
<i>C. aristata</i>	13	11.7	0.9949	1.3	0.9747	-
<i>C. arrojadoana</i>	62	55.8	0.997	6.2	0.996	-
<i>C. blanchetti</i>	82	73.8	0.9923	8.2	0.9889	-
<i>C. brachystachya</i>	48	43.2	0.9924	4.8	0.9885	-
<i>C. burchelli</i>	13	11.7	0.9985	1.3	0.998	-
<i>C. calycioides</i>	20	18	0.9583	2	0.9391	-
<i>C. cardiostegia</i>	19	17.1	0.9839	1.9	0.9759	-
<i>C. choriophylla</i>	9	8	0.9982	1	0.9973	4.07E-16
<i>C. cinearescens</i>	14	12.6	0.9991	1.4	0.9988	-
<i>C. confertifformis</i>	20	18	0.9999	2	0.9999	-
<i>C. decora</i>	16	14.4	0.9982	1.6	0.998	-
<i>C. depauperata</i>	7	6	0.9996	1	0.9995	3.62E-14
<i>C. desvauxii</i> var. <i>desvauxii</i>	23	20.7	0.9778	2.3	0.9486	-
<i>C. desvauxii</i> var. <i>langsдорffii</i>	50	45	0.9711	5	0.963	-
<i>C. desvauxii</i> var. <i>latistipula</i>	36	32.4	0.9354	3.6	0.9315	-
<i>C. desvauxii</i> var. <i>molissima</i>	57	51.3	0.9326	5.7	0.9216	-
<i>C. diphylla</i>	48	43.2	0.8928	4.8	0.8632	-
<i>C. distichoclada</i>	9	8	0.9987	1	0.9977	1.41E-16
<i>C. flexuosa</i> var. <i>flexuosa</i>	78	70.2	0.8832	7.8	0.8691	-
<i>C. lagotois</i>	6	5	1	1	1	0
<i>C. latifolia</i>	19	17.1	0.9993	1.9	0.9992	-
<i>C. mucronata</i>	27	24.3	0.9941	2.7	0.989	-
<i>C. nictitans</i> subsp. <i>brachypoda</i>	43	38.7	0.9387	4.3	0.9182	-
<i>C. olesiphylla</i>	50	45	0.9983	5	0.9981	-
<i>C. pascuorum</i>	51	45.9	0.955	5.1	0.9419	-
<i>C. pilosa</i> var. <i>luxurians</i>	16	14.4	0.9234	1.6	0.9127	-
<i>C. potentilla</i>	45	40.5	0.9983	4.5	0.9982	-
<i>C. repens</i> var. <i>multijuga</i>	58	52.2	0.9662	5.8	0.9614	-

<i>C. roraimae</i>	32	28.8	0.9732	3.2	0.9659	-
<i>C. rossicorum</i>	25	22.5	0.9991	2.5	0.9983	-
<i>C. rotundata</i> var. <i>interstes</i>	18	16.2	0.9989	1.8	0.9986	-
<i>C. rotundata</i> var. <i>rotundata</i>	38	34.2	0.9986	3.8	0.9981	-
<i>C. rotundifolia</i> var. <i>grandiflora</i>	36	32.4	0.9609	3.6	0.9498	-
<i>C. simpliflora</i>	11	9.9	1	1.1	0.9999	-
<i>C. supplex</i>	34	30.6	0.9421	3.4	0.9329	-
<i>C. swainsonii</i>	31	27.9	0.9885	3.1	0.985	-
<i>C. tragacanthoides</i> var. <i>rasa</i>	18	16.2	0.9976	1.8	0.9974	-
<i>C. tragacanthoides</i> var. <i>tragacanthoides</i>	22	19.8	0.9832	2.2	0.9664	-
<i>C. ulmea</i>	6	5	0.9665	1	0.8332	1.76E-13
<i>C. venulosa</i>	25	22.5	0.9885	2.5	0.9846	-

References

- Elith, J., S. J. Phillips, T. Hastie, M. Dudík, Y. E. Chee, and C. J. Yates. 2011. A statistical explanation of MaxEnt for ecologists. *Diversity and Distributions* 17:43–57.
- Ewel, J. J., and S. W. Bigelow. 1996. Plant Life-Forms and Tropical Ecosystem Functioning. Pages 101–126 in *Biodiversity and ecosystem process in tropical forests*. Springer.
- Fick, S. E., and R. J. Hijmans. 2017. WorldClim 2: new 1-km spatial resolution climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology* 37:4302–4315.
- Guisan, A., W. Thuillier, and N. E. Zimmermann. 2017. *Habitat Suitability and distribution models with applications in R*. Cambridge.
- Guisan, A., and N. E. Zimmermann. 2000. Predictive habitat distribution models in ecology. *Ecological Modelling* 135:147–186.
- Loomis, R. S. 1997. On the utility of nitrogen in leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:13378–13379.
- Meyer, C., P. Weigelt, and H. Kreft. 2016. Multidimensional biases, gaps and uncertainties in global plant occurrence information. *Ecology letters* 19:992–1006.
- Mod, H. K., D. Scherrer, M. Luoto, and A. Guisan. 2016. What we use is not what we know: environmental predictors in plant distribution models. *Journal of Vegetation Science* 27:1308–1322.
- Pearson, R. G., C. J. Raxworthy, M. Nakamura, and A. Townsend Peterson. 2007. Predicting species distributions from small numbers of occurrence records: A test case using cryptic geckos in Madagascar. *Journal of Biogeography* 34:102–117.

Phillips, S. J., R. P. Anderson, and R. E. Schapire. 2006. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling* 190:231–252.

Phillips, S. J., and M. Dudík. 2008. Modeling of species distributions with Maxent: New extensions and a comprehensive evaluation. *Ecography* 31:161–175.

Poggio, L., L. de Sousa, N. H. Batjes, G. B. M. Heuvelink, B. Kempen, E. Ribeiro, and D. Rossiter. 2021. SoilGrids 2.0: producing soil information for the globe with quantified spatial uncertainty. *Soil* 7:217–240.

Rando, J. G. 2014. Estudos filogenéticos, taxonômicos e biogeográficos em *Chamaecrista*, Leguminosae. Thesis. Universidade de São Paulo.

Title, P. O., and J. B. Bemmels. 2018. ENVIREM: an expanded set of bioclimatic and topographic variables increases flexibility and improves performance of ecological niche modeling. *Ecography* 41:291–307.

Zeferino, L. C., R. T. De Queiroz, J. G. Rando, M. M. T. Cota, I. F. Fantini, A. P. De Souza Caetano, and A. P. F. Perez. 2019. The genus *chamaecrista* (leguminosae: Caesalpinioideae) in parque estadual do rio preto, são gonçalo do rio preto, minas gerais, Brazil. *Rodriguesia* 70.

Figure S1 Correlation between niche overlap metrics and node age.

Figure S1: Mean niche overlap in a node as a function of node age using ARC methods. The ‘f’ and ‘p’ represent the significance of intercept and slope derived by Monte Carlo randomization. “f” is the fraction of randomized datasets with intercept and slopes greater than the observed data. “p-values” are calculated as $2 * \min(f, 1 - f)$. The data show that closely related species do not have niche overlap.

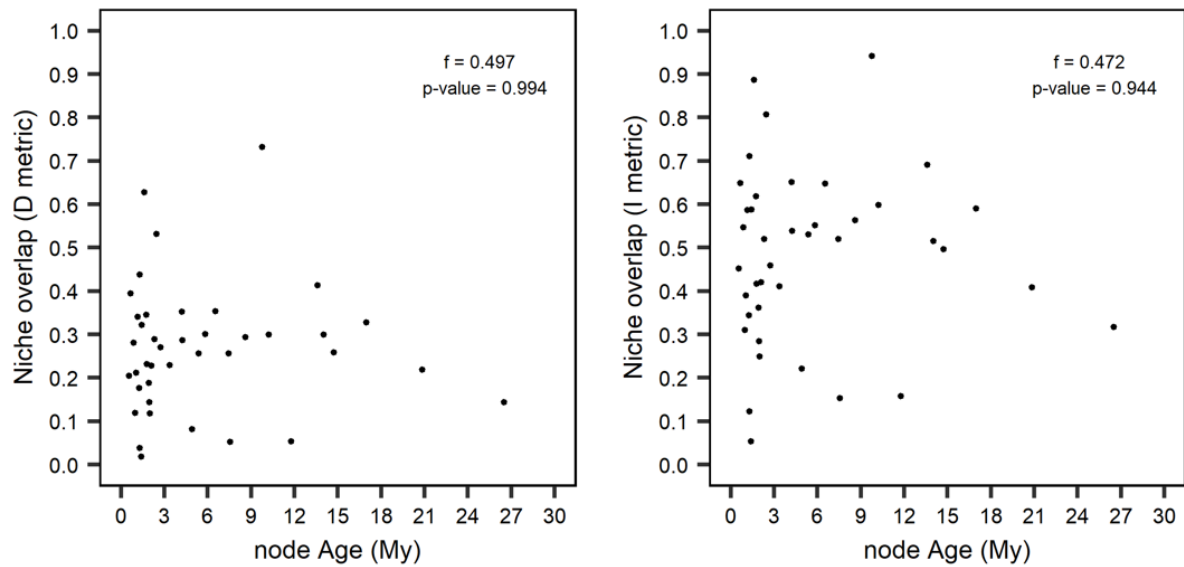


Table S2 Parametric and Monte Carlo regression analyses between niche overlap metrics, D and I, for each environmental axis and the overall environmental niche and divergence time. Niche overlap metrics were calculated pairwise over 41 taxa, and the average metric was calculated for each node.

Niche variable	overlap metric	Parametric regression				Monte Carlo test		Graphs
		<i>b</i>	SE	F	p-value	<i>f</i>	p-value	
Bio17	D	0.0031	0.004	0.5849	0.4491	0.165	0.330	Fig. S3-A
	I	0.0031	0.002	1.1930	0.2816	0.110	0.220	Fig. S3-B
Bio18	D	-0.0037	0.004	0.7252	0.3998	0.831	0.338	Fig. S2-A
	I	-0.0020	0.003	0.3481	0.5587	0.702	0.596	Fig. S2-B
Fire Frequency	D	0.0003	0.000	1.5910	0.2148	0.154	0.308	Fig. S3-C
	I	0.0001	0.000	1.4190	0.2410	0.277	0.554	Fig. S3-D
Nitrogen	D	-0.0016	0.003	0.1671	0.6850	0.656	0.688	Fig. S2-C
	I	-0.0009	0.002	0.1111	0.7408	0.637	0.726	Fig. S2-D
Overall niche	D	-0.0001	0.003	0.0003	0.9855	0.497	0.994	Fig. S1-A
	I	0.0004	0.005	0.0057	0.9402	0.472	0.944	Fig. S2-B

Figure S2 Correlation between niche overlap metrics and node age in the four niche dimensions

Figure S2: Mean niche overlap in a node as a function of node age using ARC methods. The data show that closely related species do not have niche overlap for any of the four environmental variables analyzed.

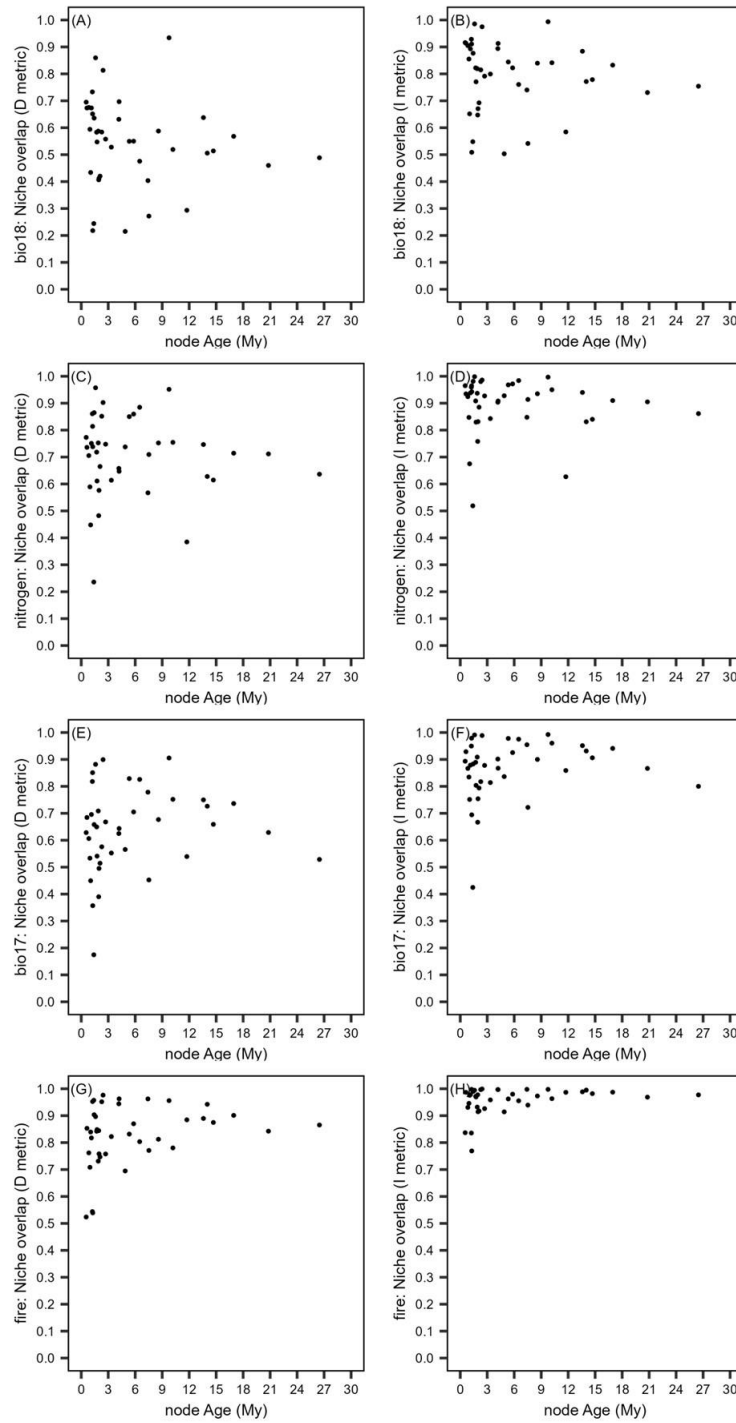


Table S3 Evolutionary transition models and their respective AICc and Δ AICc average values. We tested nine transition models with and without hidden states. ER: model estimates equal transition rates among all plant life forms. SYM: model estimates equal transition rates between each pair of life forms, but with different rates among pairs (symmetric model). ARD: model estimates different transition rates among all life forms.

Model	Hidden Markov model	Number of transition rates estimated by each model	AICc	ΔAICc
ER	no	1	72.2	0
ER/ER	yes	2	75.7	3.7
SYM	no	6	78.0	5.9
ER/SYM	yes	7	84.0	12.0
ARD	no	12	97.4	25.4
SYM/SYM	yes	12	105.3	33.2
ER/ARD	yes	13	107.4	35.4
ARD/SYM	yes	18	135.2	63.2
ARD/ARD	yes	24	212.3	140.3

Notes: The best-fit model was selected based on the Akaike weight. The AICc and Δ AICc values correspond to the average AICc in 200 phylogenetic trees. In Hidden Markov models, transition rates between different rate classes were also estimated.

Table S4 The fitting metrics between eight evolutionary models and four niche axes across 2000 SIMMAP reconstructions.

Niche dimension and fitting metrics	Evolutionary model							
	WN	BM1	BMS	OU1	OUM	OUMA	OUMV	OUMVA
BIO18								
fittings	2000	2000	2000	2000	1978	823	1863	307
best	0	0	2	290	753	1	23	0
tie	0	0	6	716	907	13	405	1
frequency %	0	0	0.1	14.5	37.65	0.05	1.15	0
NITRO								
fittings	2000	2000	2000	1990	1958	622	1944	284
best	3	0	0	0	1025	3	158	0
tie	62	0	0	72	782	3	737	0
frequency %	0.15	0	0	0	51.25	0.15	7.9	0
BIO17								
fittings	2000	2000	2000	1910	1977	808	1907	311
best	1703	0	0	20	0	0	0	0
tie	277	0	0	269	8	1	1	0
frequency %	85.15	0	0	1	0	0	0	0
FIRE								
fittings	2000	2000	1998	1940	1969	618	1914	346
best	175	0	6	0	0	8	1539	9
tie	236	0	30	87	11	26	179	15
frequency %	8.75	0	0.3	0	0	0.4	76.95	0.45

Note: **fitting**: the number of reconstructions in which the model was fitted to the data. **best**: the number of reconstructions in which the model was the best-fit to the data. **tie**: the number of reconstructions in which the best-fit model was undetermined, i.e., ΔAICc difference smaller than two between the first- and second-best model; **frequency %**: Relative frequency that a mode was the best-fit to the data. The highlighted columns indicate the best-fit model to a given niche axis.

CAPÍTULO 2

**While water scarcity constrains, higher leaf cost favors the
macroevolution of increased investment in ant–plant protection
mutualisms in seasonally dry ecosystems**

Capítulo a ser submetido para a revista *Evolution*

While water scarcity constrains, higher leaf cost favors the macroevolution of increased investment in ant–plant protection mutualisms in seasonally dry ecosystems

Abstract

Herbivory is a pervasive selective pressure on plants, driving the evolution of defenses, including protective mutualisms mediated by extrafloral nectaries (EFNs). These secretory structures attract predatory ants that deter herbivores, but the costs of maintaining such mutualisms—including nectar production and tissue loss—vary with environmental conditions, plant structure, and leaf traits. In this study, we hypothesized that EFN phenotypes evolve under natural selection to balance benefits and costs, favoring greater biotic defense investment (e.g., larger EFNs) in lineages evolving (1) costly leaf tissues and (2) slower growth strategies. We further hypothesized that water availability modulates these relationships, with (3) larger EFNs evolving in wetter environments where physiological constraints on photosynthesis and, consequently, nectar production are relaxed. Finally, we hypothesized that evolution of larger EFNs was accompanied by (4) concurrent evolution of higher extrafloral nectar volume and sugar content, enhancing plant attractiveness to ants. To test these evolutionary hypotheses, we integrated two complementary sampling schemes in a lineage of *Chamaecrista* (Fabaceae) from Seasonally Dry Ecosystems in Neotropics: extensive sampling of herbarium specimens and literature to document phenotypic variation—specifically EFN size, leaf mass per area (LMA), and plant life form, and extrafloral nectar sampling in the field to quantify nectar secretion dynamics (volume and sugar content) and ant attraction efficacy in natural populations. We applied phylogenetic path analysis to these datasets, comparing alternative models of correlated evolution to assess whether EFN evolutionary trajectories were associated with historical changes in plant life form, leaf economic traits, water availability and nectar attractiveness to ants. Our results revealed substantial interspecific variation in plant traits, with EFNs size and LMA ranging over 100 and 17-fold, respectively. As hypothesized, we found a positive evolutionary correlation between EFN size and LMA, showing that plant lineages with costlier leaves were more likely to evolved larger EFNs. This leaf-EFN relationship was also indirectly shaped by life-form evolution since perennial lineages increased biotic defense investment over time, whereas transitions to annual habits reduced it. Furthermore, larger EFNs were more likely to evolve in plants from wetter habitats, indicating that aridity has constrained ant-plant mutualism in *Chamaecrista*. In contrast, under more favorable hydrological conditions over time, some lineages evolved larger EFNs that produce greater amounts of nectar with higher sugar content, more attractive to protective ants. These findings highlight the complex

evolutionary pathways of plant trait coordination that shape the evolution of mutualisms, showing that while water scarcity imposes limitations, higher leaf construction costs promote greater investment in ant–plant protection mutualisms over evolutionary time.

Keywords: aridity gradient, defense syndromes, legumes, nectar investment, resource trade-offs, trait evolution.

Introduction

Plants exhibit a diversity of defensive strategies against herbivores. Plant investment in such strategies, however, varies widely among species. Two main hypotheses have been proposed to explain interspecific variation in plant defense investment levels. The Growth-Differentiation Balance (GDB) hypothesis proposes that plants face physiological *trade-offs* between growth and defense, such that fast-growing species tend to invest less in defensive mechanisms, while slower-growing ones allocate more resources to counter herbivory (Herns and Mattson 1992). Complementarily, the Optimal Defense (OD) hypothesis predicts that, within an individual plant, defenses are allocated to the most valuable or vulnerable organs (McKey 1974; Zangerl and Rutledge 1996). In this view, investment is optimized to protect tissues that provide the greatest fitness benefits, such as reproductive structures or tissues with high replacement costs (McKey 1974; Zangerl and Rutledge 1996). Despite addressing defense allocation at different scales, with the OD hypothesis at the within-plant level and the GDB hypothesis at the among-species level, both share the same underlying principle: defensive traits are favored when the benefits in terms of plant fitness outweigh the costs associated with the production and maintenance of defensive mechanisms (Rhoades 1979; Cipollini et al. 2017).

Since defense costs involve both the energy required to produce defensive traits and the investment in building and replacing plant tissues susceptible to herbivory, it is likely that plant's investment in defenses is associated with plant growth strategies, like those included in the plant economic spectrum. This spectrum describes a continuous gradient of plant's functional traits ranging from acquisitive to conservative strategies (Díaz et al. 2016). In this context, plants with conservative strategies, characterized by slow growth, high structural investment, and long life span, are expected to invest more in defense than acquisitive plants, which grow rapidly, have low structural investment and short life span. This pattern has already been described for direct non-biotic defenses. For example, perennial plants invest more on chemical defenses than annual ones (Rosenthal and Dirzo 1997), and species with high leaf mass per area (LMA), a proxy of plant's investment in leaf structure (Poorter et al.

2009), suffer less herbivory than species with lower LMA (Zhu et al. 2024). This evidence, however, is focused on mechanisms mediating plant investment in direct defenses in ecological time. It remains unclear how growth strategies, functional traits, and environmental conditions shape the evolution of plant defenses, especially indirect biotic defenses, such as those mediated by mutualistic interactions with protective ants.

Extrafloral nectaries (EFNs) are secretory structures mediating defensive plant–ant mutualistic interactions, with secretions composed predominantly of water and sugars (Rico-Gray and Oliveira 2007; Weber and Agrawal 2014), but also including amino acids and other compounds in smaller amounts. In this interaction, ants forage on plants for nectar and in return contribute to plant defense by consuming or repelling herbivores (Rico-Gray and Oliveira 2007; Weber and Agrawal 2014). EFNs are highly diverse and vary in their structure, location, size, quantity, and secretion features (Nogueira et al. 2012b; Marazzi et al. 2013). EFNs are known from approximately 4,480 angiosperm species (Weber 2024) and have evolved independently at least 457 times during seed plant diversification (Weber and Keeler 2013). Since the outcome of plant-ant interactions depends on context (Nogueira et al. 2012a; Leal et al. 2017, 2023, 2025), the maintenance and evolution of EFNs are expected to result from a dynamic balance between the costs and benefits of this interaction (Rutter and Rausher 2004; Nogueira et al. 2016). Thus, natural selection may either intensify the mutualism, strengthening plant investment in this biotic defense, or lead to its reduction or even breakdown when costs outweigh benefits (Bronstein 1994; Sachs and Simms 2006; Kiers et al. 2010).

Regarding the EFNs evolution, there is evidence that EFNs traits are inheritable and subject to directional selection. At the microevolutionary scale, EFNs traits are under phenotypic selection, being favored in contexts of high herbivory and availability of protective ants (Rutter and Rausher 2004; Nogueira et al. 2016). Additionally, abiotic factors like water availability and seasonality influence the number of active EFNs, their nectar production, and their size (Delgado et al. 2014), suggesting that the environmental conditions are also important drivers of EFN evolutionary trajectory. At the macroevolutionary scale, transitions of plant lineages from forests to drier open environments were associated with the evolution of reduced EFN numbers and weakened mutualistic interactions with ants (Nogueira et al. 2012b). However, in some lineages, even under low precipitation, ant interactions mediated by EFNs can still benefit plants (Leal et al. 2017, 2025), suggesting that under more restrictive conditions, certain EFN-bearing plant lineages are effectively defended by ants, with protection benefits likely outweighing the costs. These findings across temporal and spatial scales indicate that EFN evolution is shaped by multiple selective pressures,

including herbivory, mutualist partners occurrence, physiological costs, and resource availability. Nevertheless, how these factors interact to drive the evolution and diversification of plant traits associated with defensive mutualisms against herbivores remains poorly understood.

In this study, we investigated whether ant-plant protection mutualism has evolved jointly with species' functional traits and environmental niches in a clade of Fabaceae occurring in Dry Seasonal Neotropical ecosystems. Considering that extrafloral nectar, sugar content and ant attraction are determined by EFN size (Baker-Méio and Marquis 2012; Alencar et al. 2023), we hypothesized a positive evolutionary correlation among EFN size, niche water availability, and species' trait associated with leaf economic and life-history strategies (Figure 1). This hypothesis is based on the premise that natural selection acts on EFNs, favoring trait combinations that maximize biotic defense benefits while minimizing costs. Thus, we expect that plant investment in EFNs have been favored in plant species that have evolved high-water-availability niches and conservative strategies (Prochazka et al. 2024), leading to the evolution of larger EFNs. Conversely, in plants that have evolved low-water-availability niches and acquisitive strategies (Prochazka et al. 2024), selection may have favored smaller EFNs, which are less attractive to ants. Finally, we hypothesized that in lineages where larger EFNs evolved, increases in EFN size were accompanied by the concurrent evolution of greater nectar volume and sugar content, resulting in enhanced ant attraction.

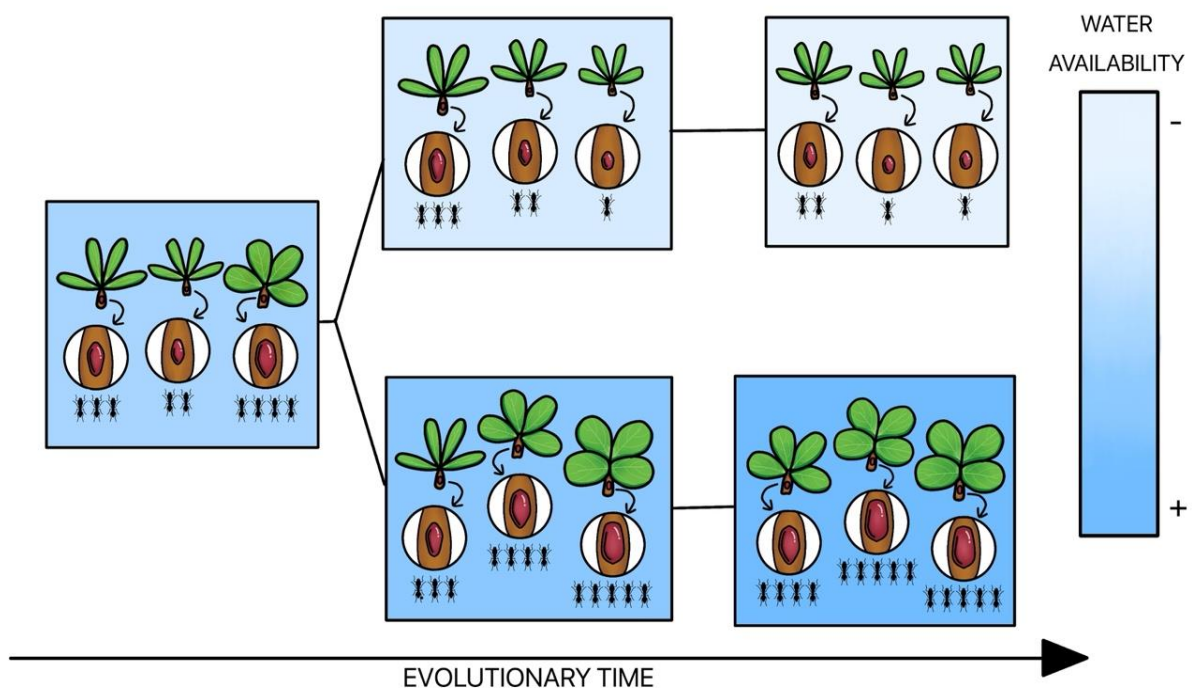


Figure 1: Rationale behind the hypothesis tested in this study. The protective mutualism between plants and ants is context-dependent, and over evolutionary time, isolated or combined factors can alter the costs and benefits of these interactions, shaping the evolution of extrafloral nectaries (EFNs). Here, we propose that water availability, plant growth strategy, and investment in leaf tissue production modify the outcomes of plant-protective ant interactions and thus exert selective pressures on EFN traits. We hypothesize that evolution toward an annual survival strategy, with low investment in leaf tissue production and in niches with reduced water availability, constrains investment in indirect defenses, favoring the evolution of smaller EFNs (upper panels). In this context, smaller EFNs minimize interaction costs, increasing the net benefit of mutualism. Conversely, in conservative-strategy species with high leaf tissue investment and in more favorable niches (lower panels), larger EFNs are predicted to be selected. Here, the cost of investing in indirect defense (mediated by EFNs) is lower than the cost of losing plant tissues to herbivory, favoring the evolution of larger EFNs.

Methods

Focal plant group

Chamaecrista (L.) Moench (Fabaceae) is a diverse genus comprising approximately 362 species organised in six sections (Cota et al. 2025). Despite its pantropical distribution, about 75% of species occur in Brazil, predominantly in open and seasonal areas (Rando et al. 2020, 2024). This study focuses on a *Chamaecrista* clade of ~142 species (sections *Otophyllum*, *Baseophyllum*, and *Chamaecrista*) (Cota et al. 2025), of which 140 possess extrafloral nectaries (EFNs). This group diversified over the last 40 million years and includes annual and perennial plant life forms distributed primarily on open seasonal Neotropical areas of the Cerrado and Caatinga (Conceição et al. 2009; Rando et al. 2016; Souza et al. 2021). Plant lineages within this group evolved distinct life-forms reflecting contrasting resource acquisition strategies (Prochazka et al. 2024). Within open seasonally dry environments, they occupy different positions along water-availability gradients: annual species typically inhabit drier environments, while perennials occur in wetter habitats, reflecting joint evolution of environment niche and life-form (Prochazka et al. 2024).

Extrafloral nectaries (EFNs) in *Chamaecrista* are highly diverse on the leaves and are predominantly located on the petiole, with a few species also bearing them on the leaf rachis. They vary in size, structure, and nectar secretion volume (e.g., Alencar et al. 2023). Anatomical and histochemical analyses show that nectar consists of water, sugars, amino acids, lipids, and phenolic compounds (Coutinho et al. 2012, 2022; Silva et al. 2017). Field observations and experiments confirm that species with larger EFNs secrete more nectar and attract higher ant diversity/abundance than those with smaller nectaries (Baker-Méio and Marquis 2012; Alencar et al. 2023). Furthermore, ants enhance plant reproductive success, indicating EFNs' functional role in plant fitness (Nascimento and Del-Claro 2010).

Phylogeny of the focal group

We performed all our analyses using the most recent time-calibrated phylogeny of focal plants (Rando et al. in review). The phylogeny included 231 *Chamaecrista* species (68

from our focal group), reconstructed using 5,250 characters from five molecular markers: nuclear ITS and ETS, and plastid trnD-T, trnL-F, and trnK-matK. Dating incorporated two calibration points: a primary point based on a *Senna* fossil (Herendeen et al. 2003) and a secondary point using the tribe Cassiae age (Bruneau et al. 2008).

For macroevolutionary analyses, we pruned the phylogeny to retain only our focal group species (sections *Otophyllum*, *Baseophyllum*, and *Chamaecrista*) and removed 17 species for which data on EFN traits and life-history strategy were incomplete. Thus, our macroevolutionary analyses included 51 species. To incorporate phylogenetic uncertainty, we used 100 trees sampled from the Bayesian posterior distribution (Rando *et al. in review*).

Study design

To investigate the evolution of extrafloral nectaries (EFNs) and their association with protective ants, and whether these traits co-evolved with plant traits associated with leaf economic and life-history strategies and environmental water niche, we employed two complementary sampling approaches. The first broad-scale approach utilized herbarium data on foliar phenotype and EFN size across species, which resulted in data collection from 185 herbarium specimens representing 51 species. The second approach involved field data collection from 361 individuals across natural populations of 24 focal species ($N = 15$ individuals per population). In this second approach, we measured EFN size and foliar phenotype as in the first approach, and additionally recorded nectar volume, sugar content, and plant–ant interactions for each individual plant in the field. The combination of both approaches allowed characterization of species phenotypes and assessment of trait mediating ant interactions that may shape ant-mediated biotic defense.

In both sampling strategies, we measured EFN size and leaf tissue investment of each plant species. Nectar descriptors (i.e. nectar volume ($\mu\text{L}/\text{leaf}$) and sugar mass content (mg/leaf)) and ant visitation were recorded exclusively in natural populations, in the field. Traits serving as proxies for plant's investment in biotic defense included extrafloral nectary size, nectar volume, and sugar mass content. We used LMA (leaf mass per area) as a proxy for leaf tissue investment (Poorter et al. 2009), and life history strategy (annual vs. perennial) as a proxy for ecological resource-use strategy (acquisitive vs. conservative). Across both approaches, we estimated nectary size as nectary area (mm^2) and calculated the LMA as leaf mass divided by leaf area (g/m^2) (Cornelissen et al. 2003; Poorter et al. 2009). We obtained life form and species-specific water availability data from literature sources.

Collection of Plant Phenotypes in the Herbarium

To estimate extrafloral nectary size and leaf mass per area (LMA), we collected leaves from dried specimens deposited in four herbariums: HUFABC, K, RB e SPF, and K. Visits to the herbaria were conducted between 2022 and 2024. We selected the specimens to be sampled according to material availability, prioritizing those identified by a taxonomist specialized in the plant group. Leaf sampling followed the specific collection rules of each herbarium, prioritizing specimens with loose and intact leaves and with the extrafloral nectaries preserved. Additionally, for specimens of the same species, we sought to include samples collected in different localities and by different collectors, to capture intraspecific variation. We obtained complete data from 185 specimens of 51 species. On average, we analyzed 3.6 specimens per species (maximum of 7 per species). Due to limited available material, seven species were represented by a single specimen.

To estimate extrafloral nectary size from herbarium specimens, we used a stereomicroscope (ZEISS Stereo Discovery.V12) with an attached camera (Axiocan 305 color). We took frontal scaled photos of the largest nectary on the leaf. In all cases, the largest EFN was located on the leaf petiole. We analyzed the pictures using ZEN lite software (version 3.8), in which we measured the nectary area based on the manual outline of the secretory structure where the nectar accumulates. For LMA estimation, we removed leaflets from the rachis and then scanned the leaflets together with a scale. We estimated the leaflet area using ImageJ software (version 1.53), which was initially expressed in cm² and then converted to m². The dry mass of leaflets, previously oven-dried at 60 °C until constant weight, was measured using an analytical balance with a precision of 0.001 or 0.0001 g. Leaf Mass per Area (LMA) was calculated as dry mass divided by leaf area (g/m²).

Collection of Plant Phenotypes and Ant Attendance in Natural Populations

For data collection in natural populations, we conducted five field expeditions between September 2019 and January 2025. During the expeditions, we mapped and marked 13 to 16 individuals (average of 15 individuals per population) in 24 populations, each corresponding to a distinct *Chamaecrista* species, totaling 361 marked individuals. The sampled populations are located in four Brazilian states (Bahia, Minas Gerais, Ceará, and São Paulo) and occur along different portions of a water availability gradient within seasonally dry regions of Brazil (Supplementary Material S1).

To ensure that sampling of one trait did not interfere with the others, we followed a standardized sampling protocol in each population. First, we conducted a census to estimate the proportion of ant visitation in the population. For that, we conducted direct observations on all marked individuals in each population. We focused our observations on one focal

branch per plant and recorded, for a period of five minutes, the number of ants interacting with the EFNs. We considered that an interaction occurred when observed ant workers from any species touching the nectary with its head and did not count the same ant more than once. After the observation period, we conducted a census, counting the number of ants moving on the plant.

After observing the patterns of ant visits, we collected data on nectar volume and sugar concentration. For that, we selected branches from marked individuals in each population, prioritizing those with current and healthy season leaves, free of damages (e.g., holes caused by borers or other phytophagous insects, or the presence of aphids that could attract ants with their honeydew). We cleaned these chosen branches to remove any nectar-feeding organisms and, using masking tape, bagged them with a transparent plastic bag (Nogueira, 2015, Alencar et al. 2023). Bagging prevents the secreted nectar from being consumed and reduces its evaporation. To ensure that no nectar feeders could access the bagged branches, we applied tanglefoot at the base of the branch. Branches were bagged in the afternoon, always after 4 PM, and the minimum bagging period was 12 hours. After the bagging period, branches were unbagged and the nectar accumulated in each nectary on the focal branch was collected using 1 μ L or 2 μ L microcaps (Drummond) (Nogueira, 2015, Alencar et al. 2023). We measured the nectar volume in each microcap using a digital caliper, converting it later into nectar microliters (μ L). Nectar sugar concentration was measured using a low-volume portable refractometer (Eclipse 0–50 °Brix Handheld Refractometer). For this, we transferred the total nectar volume secreted by all extrafloral nectaries on the branch to the prism surface of the refractometer, and sugar concentration was measured in °Brix. As the refractometer requires a minimum volume and measures up to 50 °Brix, we diluted the nectar with distilled water nectar exhibited lower volume or higher concentration than the device limit. For this, we applied a known amount of distilled water to the refractometer prism and then measured the diluted sugar concentration in °Brix. For diluted samples, we calculated the original concentration based on the applied dilution factor. To obtain the mass of secreted sugar in mg we used the equation proposed by Dafini et al. (2005).

Finally, for all marked individuals, we collected leaves for measuring extrafloral nectary size and LMA. LMA measurements followed the same procedures used for herbarium specimens, with the difference that leaf area was determined from fresh material immediately after leaf collection. This procedure avoids reductions in leaf area caused by drying. Leaves collected to measure nectary size were fixed immediately after collection in FAA solution (formaldehyde, acetic acid, and 50% alcohol) for 24 h and then stored in 70% alcohol. We measured extrafloral nectary from fixed leaves, following the same protocol used for

measuring EFN size in herbarium plants, described above. Fixing fresh material preserves the original shape and dimensions of the EFNs, minimizing distortions associated with desiccation.

Water availability and ecological strategy

Considering the economics spectrum theory, we classified the *Chamaecrista* plants included in our dataset as annuals or perennials as a proxy for resource use and acquisition strategy. For this, we used information from a previous study that evaluated the evolutionary trajectory of *Chamaecrista* plant life form (Prochazka et al. 2024). This study classified all species of our focal *Chamaecrista* clade (sections *Otophyllum*, *Baseophyllum*, and *Chamaecrista*) into four life forms following: therophytes, chamaephytes, phanerophytes, and geophytes. According to this classification, all life forms are perennials, except the therophytes, which complete their life cycle in a favorable season of a single year. Therefore, we classified the therophyte *Chamaecrista* species as annuals (representing an acquisitive strategy) and grouped chamaephytes, phanerophytes, and geophytes together as perennial plants (representing a conservative strategy).

We used species' predicted niche values for precipitation during the warmest quarter (bio18) as a proxy for water availability in their environments, following the approach detailed in Prochazka et al. (2024). This procedure involves two distinct steps. First, we performed environmental niche modeling to estimate each species' potential distribution based on climatic and environmental predictors. This step addresses the limitation of using only known occurrence points, which often underrepresent the full environmental range a species can occupy, and instead predicts the most likely distribution given suitable conditions. Second, we extracted bio18 values from the areas with the highest predicted suitability in each species' modeled distribution, generating a distribution-weighted estimate of precipitation conditions. This approach contrasts with simply calculating the mean precipitation from raw occurrence records, which ignores unsampled suitable areas and can substantially bias environmental estimates. For the 13 species not included in Prochazka et al. (2024), we applied the same modeling procedures and environmental predictors described in that study to obtain comparable precipitation niche values.

Data processing

Due to low nectar secretion and refractometer limitations, we removed nectar samples with less than 0.2 μ L from our analysis regarding extrafloral nectar concentration. The low volume of these samples greatly compromises the precision of the concentration

measurements on the refractometer. We also excluded measurements with diluted concentrations equal to or lower than 2° Brix, as these values fall within the device's margin of error. Additionally, for nectar samples that required dilution and had an initial concentration greater than 80° Brix, we replaced the concentration value with the highest measurement obtained for another individual from the same population. This adjustment, applied to 18 individuals, was intended solely to enable the calculation of estimated total sugar mass in cases where the original measurement was unreliable after dilution, while keeping the original nectar volume unchanged. This procedure minimizes distortion in sugar mass estimates while maintaining consistency within each population.

Most of the comparative analyses used in this study require a single trait value per species; in these cases, we summarized individual trait data using species-level metrics. For extrafloral nectary size and LMA, we used the median value per species, as these traits are expected to remain relatively stable after full leaf expansion in the absence of herbivory. This statistic minimizes the influence of extreme values, being more likely to reflect the typical leaf phenotype of the species. In contrast, extrafloral nectar volume and sugar mass are dynamic variables that can change over short periods in response to leaf age, plant resource availability, and other physiological or environmental factors (Heil 2011). Because low or zero values may reflect temporary restrictions or functional impairment of the focal leaf rather than the species' typical investment level, we used the maximum observed nectar volume and sugar concentration from the sampled focal branch of each plant to represent its potential investment in the biotic defense. This approach captures the maximum resources a plant can allocate to protective ants via a single leaf, minimizes sampling bias, and avoids underestimating production potential by relying on point averages. The same criterion was applied to sugar mass, calculated based on the leaf with the highest recorded nectar volume.

To estimate the potential attractiveness of each *Chamaecrista* species to ants, we used a simple metric based on the presence or absence of ants on individual plants within each sampled population in the field. Given that ants are abundant across all ecosystems and habitats, their simple presence on plants is more indicative of the plants' ability to attract them since binary variable is less sensitive to short-term fluctuations in ant recruitment behavior, allowing for more consistent comparisons among species and over time (Baker-Méio and Marquis 2012; Nogueira et al. 2020). For each species, we calculated the proportion of individuals observed with ants relative to the total number of individuals recorded in the population as our metric of plant attractiveness. Preliminary observations revealed extreme cases: some species had populations with no individuals attended by ants, while others had populations where all observed plants were attended by ants.

Evolutionary Model-Based Data Analysis

To investigate the macroevolution of extrafloral nectary size, we fitted three alternative evolutionary models: Brownian Motion (BM), Ornstein–Uhlenbeck (OU), and Pagel’s lambda (λ). The BM model describes stochastic trait evolution where variance accumulates proportionally with time, consistent with genetic drift or random walk processes (Felsenstein 1985). The OU model incorporates stabilizing selection toward an optimal trait value, with an attractive force pulling traits toward this optimum (Hansen 1997). The λ model quantifies phylogenetic signal strength by scaling branch lengths, estimating the degree of trait dependence due to shared evolutionary history (Pagel 1999). When $\lambda = 1$, the model is equivalent to BM; $\lambda = 0$ indicates phylogenetic independence. We compared the fit of these models using AICc and found that, in our dataset, the λ model had the lowest AICc value. Therefore, this model was selected for use in ancestral state reconstruction analyses. Ancestral state reconstruction of nectary size was performed via maximum likelihood using the *phytools* package (Revell 2012).

To test the hypotheses regarding the evolutionary correlation between extrafloral nectary size and other plant traits, we employed Phylogenetic Path Analysis (PPA). This framework integrates phylogenetic comparative methods with path analysis (Hardenberg 2013; Gonzalez-Voyer & Hardenberg 2014), enabling assessment of a priori hypothesized relationships, including direct and indirect evolutionary dependencies, while explicitly incorporating the phylogenetic variance-covariance matrix to account for shared ancestry in parameter estimation. We conducted two complementary PPA analyses testing correlated trait evolution. In our first PPA, we used herbarium specimen data to evaluate whether nectary size exhibited correlated evolution with leaf mass per area (LMA), plant growth form, and niche water availability. The modeling approach proceeded in two key stages. First, a preliminary analysis identified trait covariations evolving independently of nectary size, with its best-supported model serving as our null model (Supplementary Material S2). This null model represents the evolutionarily simplest scenario where nectary size changes occur independently of all other traits and water availability during *Chamaecrista* diversification. Subsequently, this null model provided the foundational structure for all subsequent models. We then systematically developed seven progressively complex models by incrementally adding evolutionary dependencies to this baseline framework, ranging from scenarios where nectary size co-evolved with single traits to models incorporating joint evolution with multiple traits and water availability (Supplementary Material S3).

In our second Phylogenetic Path Analysis (PPA), we used field-collected data from natural populations to evaluate whether nectary size evolved in correlation with nectar

secretion traits (volume and sugar mass), and whether these rewards were associated with changes in the evolution of plant attractiveness to ants. Although 361 individuals representing 24 *Chamaecrista* species were initially marked, we were able to measure all the extrafloral nectar traits in only 162 individuals across 21 species (mean 7.7 ± 5.0 individuals per species). Mirroring our first PPA's approach, we first conducted a preliminary analysis to identify evolutionary covariations among nectar traits. This analysis also tested expected allometric relationships, since it is likely that increasing in nectary size favors the increasing in extrafloral nectar production. We compared alternative models in which nectary size affected only nectar volume, only sugar mass, both traits simultaneously, or neither trait (Supplementary Material S4). As in the previous analysis, the best-supported model was selected and used as the null model for subsequent analyses. This null model represents the evolutionarily simplest scenario where changes in plant attractiveness to ants occur independently of nectar trait evolution. Building upon this foundation, we developed seven progressively complex models through incremental addition of evolutionary dependencies (Supplementary Material S5). The simplest scenarios introduced evolutionary links where a single nectar trait (volume or sugar mass) directly influences plant attractiveness, while the most complex scenario featured joint evolution where both nectar traits collectively determine attractiveness.

To meet assumptions of normality and homoscedasticity, we transformed variables prior to modeling. Nectary area, nectar volume, and sugar mass were log-transformed, while the proportion of ant-attended plants were logit transformed. All variables were then z-score standardized to ensure comparable units. For PPA, we implemented Pagel's λ model to structure the phylogenetic variance-covariance matrix in all cases. Model adequacy was assessed using the C-statistic, with $p > 0.05$ indicating acceptable fit. Competing models were compared using the small-sample-size corrected version of the C-statistic Information Criterion (CICc). Following established thresholds (Cardon et al. 2011; Gonzalez-Voyer & Hardenberg 2014), models with $\Delta\text{CICc} < 2$ were considered equally plausible; in these cases, we computed weighted-average regression coefficients across top-performing models. To incorporate phylogenetic uncertainty, all analyses were replicated across 100 alternative phylogenies using the *phylopath* package (Van der Bijl 2018) in R.

Complementarily, we explored evolutionary associations between nectar production and ant attendance using Phylogenetic Generalized Linear Mixed Models (PGLMMs) with binomial distributions. Here, ant presence/absence served as the response variable, while significant PPA relationships guided predictor selection: one model featured maximum nectar volume as predictor, another sugar mass. Species identity was included as a random effect,

with the phylogenetic matrix specifying the variance-covariance phylogenetic structure. These analyses were repeated across 100 phylogenetic trees to account for phylogenetic uncertainty.

Results

We found substantial variation in EFN size and LMA across *Chamaecrista* species (Figure 2). EFN area ranged from 0.03 mm² in *C. pilosa* to 3.51 mm² in *C. lagotois* (Figure 2), with a genus-wide mean of 0.64 ± 0.68 mm². LMA values varied from 20.02 g/m² (*C. pilosa*) to 346.43 g/m² (*C. confertifomis*), averaging 108.51 ± 56.40 g/m² (Figure 2). The phylogenetic signal estimated under the best-fitting model (Pagel's $\lambda = 0.47$) indicates moderate phylogenetic structure in EFN size. Ancestral state reconstruction revealed multiple evolutionary shifts in EFN size, occurring both among and within taxonomic sections of the genus (Figure 2).

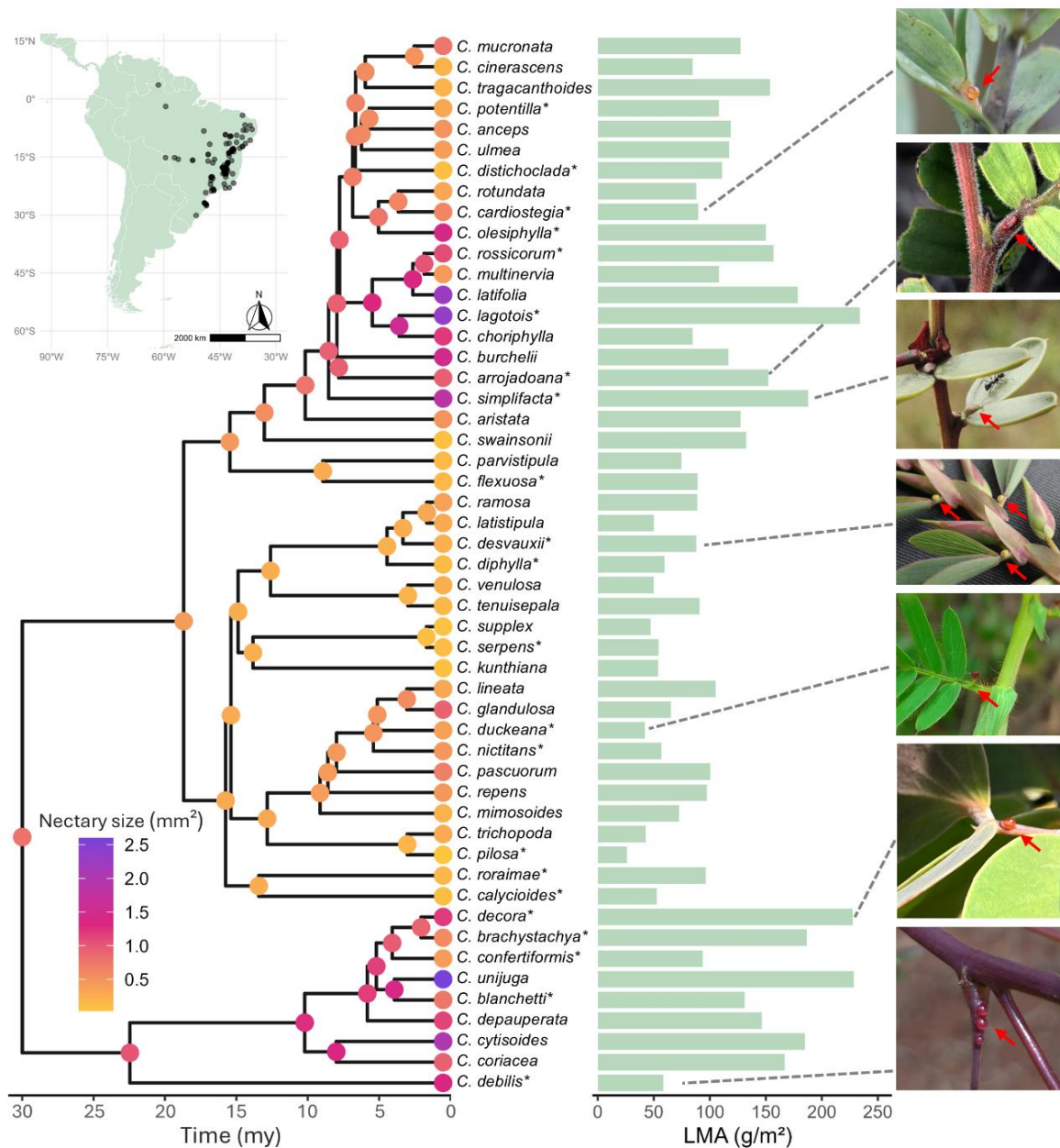


Figure 2. Ancestral state reconstruction of extrafloral nectary size and variation in LMA among different *Chamaecrista* species. The map shows the collection sites of herbarium specimens in South America. Species marked with * are the 21 species for which we obtained complete data on ant visitation, nectar volume, and extrafloral nectary sugar secretion. Photographs illustrate the structural and size diversity of extrafloral nectaries. From top to bottom: *C. cardiostegia* H.S.Irwin & Barneby, *C. arrojadoana* (Harms) Rando, *C. simplifolia* H.S.Irwin & Barneby, *C. desvauxii* (Collad.) Killip, *C. duckeana* (P.Bezerra & A.Fern.) H.S.Irwin & Barneby, *C. decora* (H.S.Irwin & Barneby) Conc., L.P.Queiroz & G.P.Lewis, and *C. debilis* (Vogel) H.S.Irwin & Barneby.

Coordinated Evolutionary Shifts in Extrafloral Nectary Size, Leaf Investment (LMA), and Water Niche

Among the eight evolutionary models evaluated in the phylogenetic path analyses (PPA), the model that best fit the data ($C = 1.07$, $p = 0.90$; Table 1, Figure 3A) described correlated evolution between extrafloral nectary (EFN) size, leaf mass per area (LMA), and water niche. This model indicated that during *Chamaecrista* diversification, larger EFNs evolved jointly with (i) increasing of LMA values ($\beta = 0.48$, 95% CI: 0.21–0.77), and (ii) occupation of environmental niches with greater water availability ($\beta = 0.31$, 95% CI: 0.08–0.53) (Figure 3B–C). Indirectly, this model indicates that the evolution of more acquisitive, fast-growing annual lineages resulted in smaller EFNs, whereas slow-growing, conservative perennial lineages evolved larger EFNs, reflecting a higher investment in biotic defense. These results remained consistent when accounting for phylogenetic uncertainty (gray lines in Figure 3).

Table 1: Comparison of correlated evolution models tested in the phylogenetic path analysis. For each model (see Supplementary Material S3), we report the number of parameters (k), conditional independencies tested (q), C-statistic (C) with p-value, small-sample corrected information criterion (CICc), Δ CICc (difference from best model), relative likelihood (l), and model weight (w). Model D (bolded) shows the best fit (Δ CICc = 0, $w = 0.70$) and is detailed in Figure 3. The null model shows the worst fit.

Model	k	q	C	p-value	CICc	Δ CICc	l	w
D	2	8	1.07	0.90	20.5	0	1.00	0.70
G	1	9	0.19	0.91	22.6	2.08	0.35	0.25
F	2	8	7.51	0.11	26.9	6.44	0.04	0.03
B	3	7	10.79	0.10	27.4	6.9	0.03	0.02
E	2	8	11.87	0.02	31.3	10.8	0.00	0.00
A	3	7	16.57	0.01	33.2	12.67	0.00	0.00
C	3	7	17.95	0.01	34.6	14.05	0.00	0.00
Null	4	6	28.39	0.00	42.3	21.8	0.00	0.00

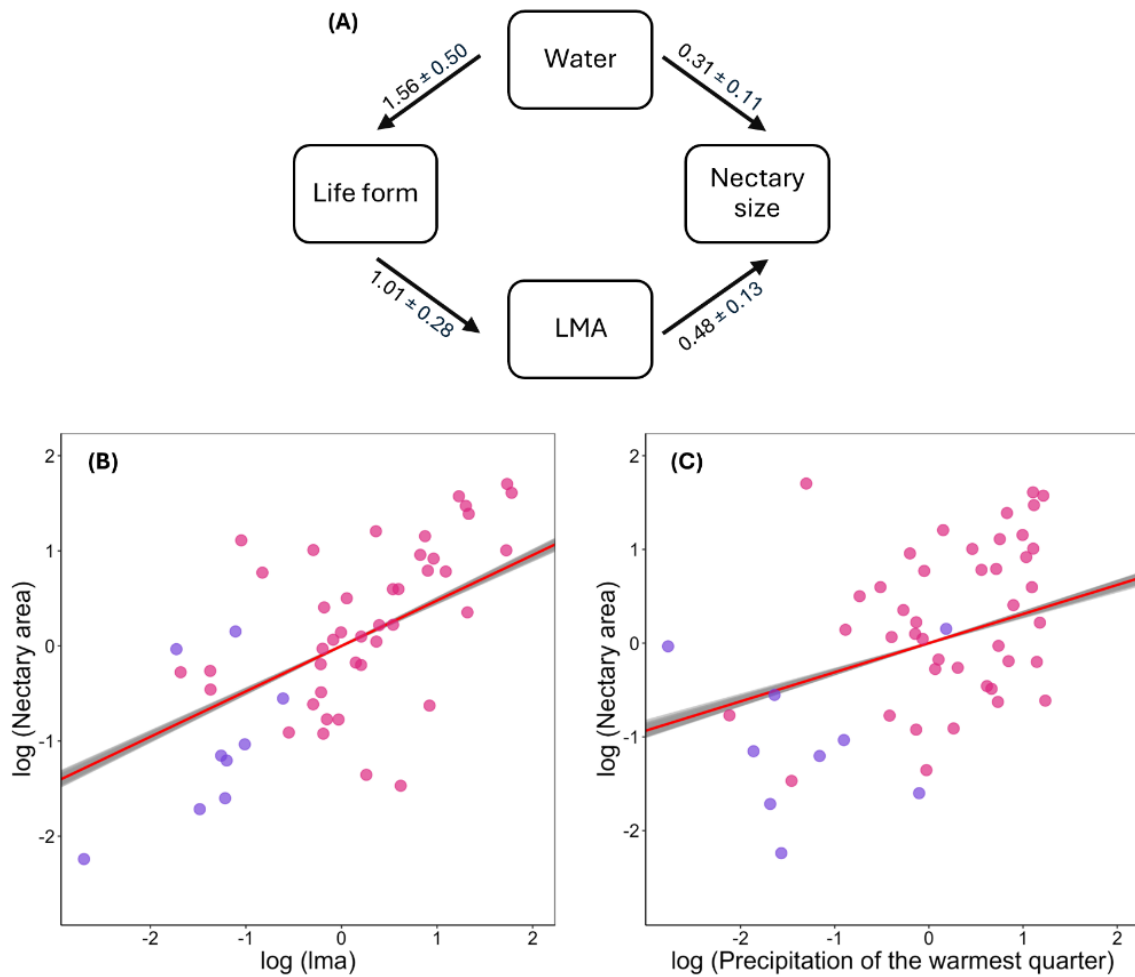


Figure 3: Phylogenetic path analysis of evolutionary relationships among variables under the model D (best-fit model; see Table 1). **A)** Model D estimated parameters ($\Delta\text{CICc} = 0$) showing standardized regression coefficients $\pm$ SE. **B-C)** Correlated evolution between EFN size and (B) leaf mass per area (LMA) or (C) water availability niche. Red line: evolutionary regression estimates from the consensus phylogeny; gray lines: estimates from 100 alternative phylogenetic trees. Points represent a species-level values (*Chamaecrista* spp.; purple = annual, pink = perennials).

The evolution of plant lineages more attractive to ants: larger extrafloral nectaries with higher secretion volume and richer in sugar.

Among the seven correlated evolution models evaluated in the phylogenetic path analysis (PPA), the two best-supported models ($\Delta\text{CICc} < 2$; Table 2) described correlated evolution between EFN size, nectar volume, and nectar sugar mass, and were considered equally probable evolutionary scenarios.

Both best-fitted models indicated that during *Chamaecrista* diversification, larger extrafloral nectaries (EFNs) evolved jointly with (i) greater nectar volume ($\beta = 0.64$, 95% CI: 0.33–0.96) and (ii) higher sugar mass ($\beta = 0.37$, 95% CI: 0.21–0.94) (Figures 4A–D). Furthermore, both models demonstrate that higher sugar secretion coevolved with greater nectar volume ($\beta = 0.65$, 95% CI: 0.45–0.86) (Figures 4E). The Model D ($C = 3.71$, $p = 0.45$, $\Delta\text{CICc} = 0$) indicated that only nectar volume evolution is associated with ant attractiveness

($\beta = 0.70$, 95% CI: 0.40–1.02). Conversely, the Model E ($C = 5.45$, $p = 0.24$, $\Delta\text{CICc} = 1.74$) indicated that only nectar sugar mass evolution has been associated with increased ant attractiveness ($\beta = 0.70$, 95% CI: 0.39–1.01) (Figure 4A–B). Results remained consistent when accounting for phylogenetic uncertainty (gray lines in Figure 4). In summary, the evolution of larger EFNs was accompanied by concurrent increases in nectar volume and sugar content, enhancing ant attraction and reinforcing biotic defense through trait synergy, whereas the opposite pattern was observed in lineages that evolved smaller extrafloral nectaries.

Table 2: Comparison among correlated evolution models tested in the phylogenetic path analysis. For each model (see Supplementary Material S5), the table shows the number of estimated parameters (k), the number of conditional independencies tested (q), the C statistic (C), the p-value for the independence test, the small-sample corrected information criterion (CICc), the difference in CICc relative to the best model (delta_CICc), the relative likelihood (l), and the model weight (w). Model D has the best fit ($\Delta\text{CICc} = 0$) and the highest relative support ($w = 0.67$) but is equally likely as model E; both are in bold and depicted in Figure 4A. The null model shows the worst fit.

model	k	q	C	p-value	CICc	ΔCICc	l	w
D	2	8	3.71	0.45	31.7	0	1.00	0.67
E	2	8	5.45	0.24	33.5	1.74	0.42	0.28
F	1	9	2.64	0.27	37	5.29	0.07	0.04
A	3	7	27.71	0.00	50.3	18.62	0.00	0.00
B	3	7	29.45	0.00	52.1	20.36	0.00	0.00
C	2	8	26.64	0.00	54.6	22.93	0.00	0.00
null	4	6	49.71	0.00	67.7	36	0.00	0.00

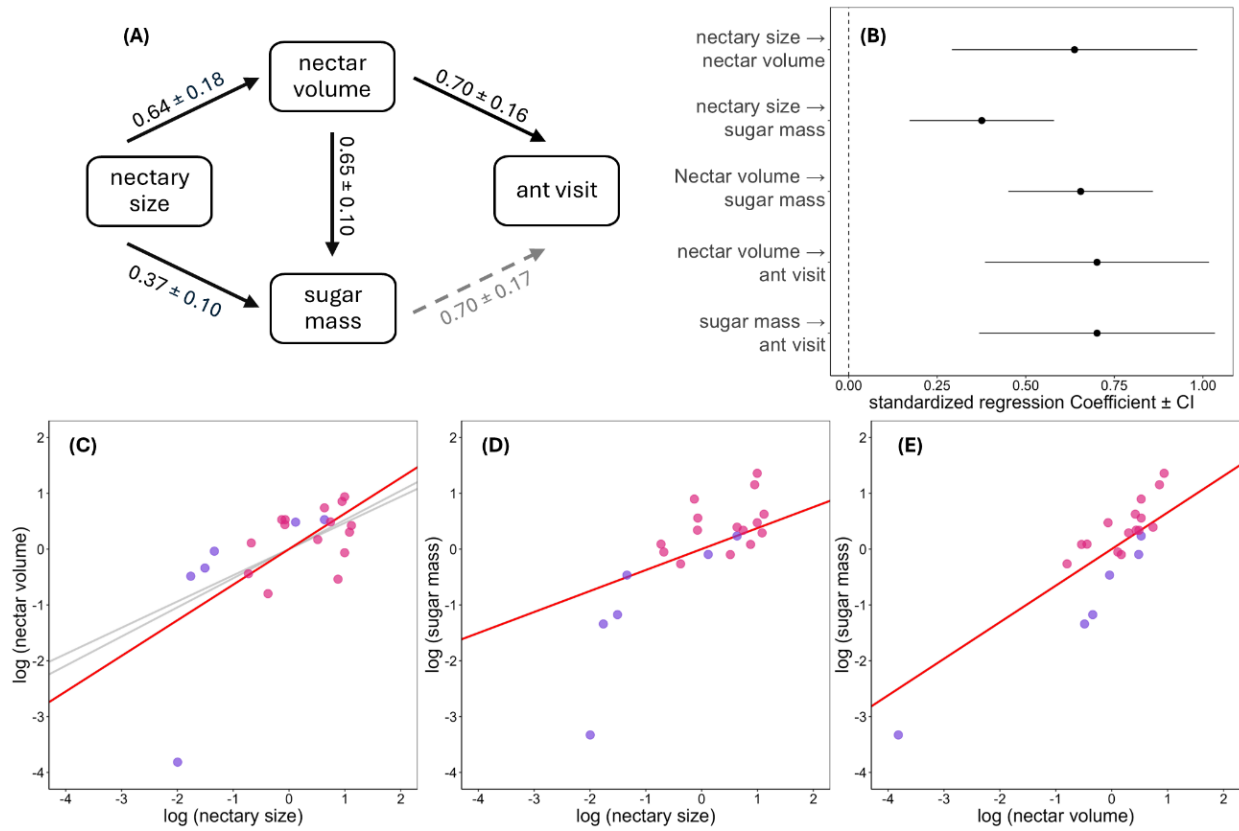


Figure 4: Phylogenetic path analysis of evolutionary relationships among extrafloral nectary and nectar traits under the models D and E (best-fit models; see Table 3). **A)** Model D estimated parameters ($\Delta \text{CICc} = 0$) showing standardized regression coefficients $\pm$ SE, with the dashed arrow indicating the evolutionary correlation supported by the Model E – the second-best model; **B)** Regression coefficients averaged across the two best models from the phylogenetic path analysis with their confidence intervals; **C-D)** Correlated evolution between EFN size and (C) nectar volume or (C) sugar mass content; **E)** Correlated evolution between nectar volume and sugar mass content. Red line: evolutionary regression estimates from the consensus phylogeny; gray lines: estimates from 100 alternative phylogenetic trees. Points represent a species-level values (*Chamaecrista* spp.; purple = annual, pink = perennials) standardized as z-scores.

The coefficients estimated by the PGLMM models are consistent with those obtained in the phylogenetic path analysis. In these models, we also showed that the evolution of larger nectar volumes and higher sugar content have respectively increased plant attractiveness (nectar volume: $\beta = 0.99$, $\text{SE} = 0.37$, $p = 0.007$; Figure 5A) (sugar mass: $\beta = 1.33$, $\text{SE} = 0.34$, $p < 0.001$; Figure 5B). The results remain consistent even when accounting for phylogenetic uncertainty.

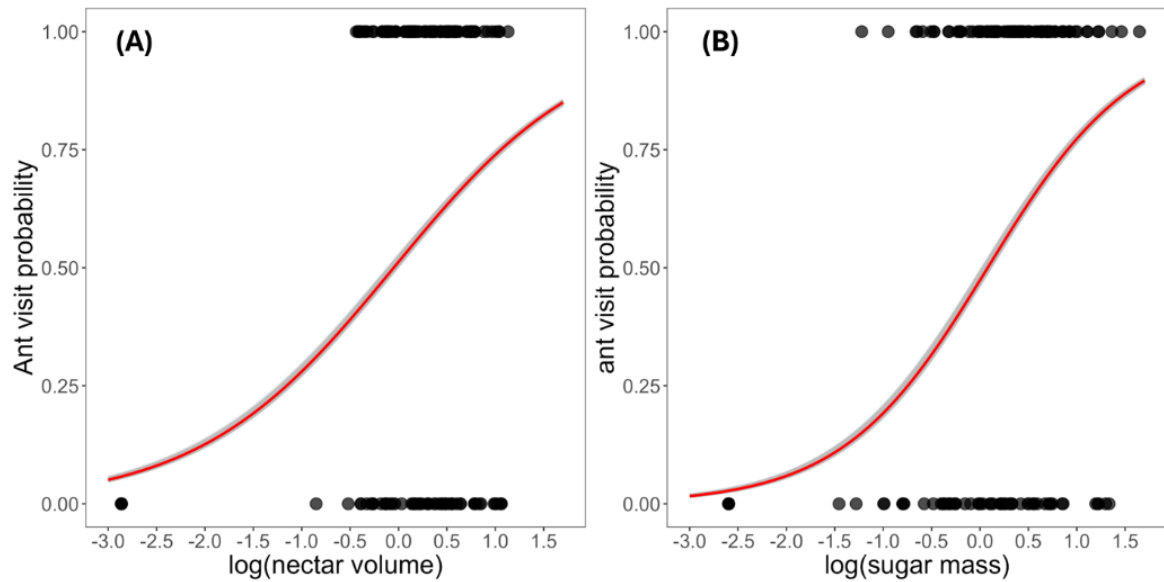


Figure 5: Probability of ant visitation to plants as a function of nectar traits, revealing evolutionary patterns. Graphs depict predictions from the PGLMM analysis, showing how nectar traits influence ant interaction probability. **A)** Predicted probability of ant visitation as an evolutionary function of nectar volume per leaf. **B)** Predicted probability of ant visitation as an evolutionary function of total secreted sugar content. The red line represents the PGLMM-predicted relationship between nectar traits (volume/sugar) and ant interaction probability for the phylogenetic consensus tree. Gray lines show model predictions across 100 alternative phylogenetic trees, reflecting phylogenetic uncertainty. Points represent individual plant specimens, not species averages.

Discussion

In this study, we investigated whether plant biotic defense mediated by protective ant mutualism evolved jointly with variation in leaf economic traits (LMA) and life-history strategies (annual vs. perennial), and with changes in species' environmental niches. Our results corroborate our original hypotheses that natural selection acted on the evolution of EFNs by maximizing benefits and reducing costs of this defensive mutualistic interaction. The joint evolution between larger EFNs, leaves with higher LMA values, and niches greater water availability reinforces the idea that conservative strategies favor the evolution of greater investment in biotic defense, an expectation initially proposed and empirically tested for chemical defenses (see Herms and Mattson 1992). This evolutionary pattern indicates that biotic defense is not as inexpensive as previously expected (e.g. O'Dowd 1979), being intensified in plant lineages where the relative cost of losing plant tissues is higher. We also corroborated the hypothesis that the evolution of increased nectar secretion with higher sugar mass evolved jointly with nectary size, and that the evolution of lineages with these traits makes them more attractive to ants. Collectively, these results provide evidence that extrafloral nectaries in *Chamaecrista* evolved due to multiple factors and that the costs and benefits of this protective mutualism represent a significant selective force in the evolution of plant traits.

Coordinated evolution between extrafloral nectaries and plant traits

Ancestral state reconstruction of EFNs indicates that while closely related *Chamaecrista* species exhibit similar EFN sizes, this trait's evolution is not solely explained by lineage divergence time. Multiple independent evolutionary shifts in EFN size demonstrate significant evolutionary lability, supporting the hypothesis that diverse selective pressures shaped EFN evolution within this lineage. Thus, although shared ancestry partially explains phenotypic divergence in EFN size, natural selection played a key role in diversifying these structures across plant species evolving under different ecological contexts.

The evolutionary lability of EFNs and their positive association with LMA during *Chamaecrista* diversification indicate that these traits evolved jointly, likely responding to similar selective pressures. The Growth-Differentiation Balance (GDB) and Optimal Defense (OD) theories provide the theoretical framework for this result. GDB theory posits that plants face an evolutionary dilemma: physiological constraints prevent simultaneous investment in defense and growth (Herms & Mattson 1992). Considering chemical defenses, lineages under fewer resource constraints (e.g., annuals) evolved high growth/reproduction investment, enabling easy tissue replacement after herbivory and reducing selection for intensified chemical defenses. Conversely, lineages in restrictive environments evolved slower growth strategies with lower metabolism, as seen in perennials with high leaf mass per area (LMA). These plants typically invest more in chemical defenses, reflecting a *trade-off* where reduced growth and metabolic rates are coupled with higher energy costs for tissue replacement (Herms & Mattson 1992). Biotic defenses via extrafloral nectaries, however, have often been considered low-cost, since nectar secretion usually demands less than 1% of a plant's daily photosynthetic production, allowing their maintenance even under resource limitation (Heil 2003). Our results contrast with this expectation, showing that EFN-based defenses in conservative lineages follow the same growth–defense *trade-off* predicted for chemical defenses, indicating that extrafloral nectar production can represent a significant investment for plants. Our results indicate plant investment in biotic defenses mediated by extrafloral nectar is higher in *Chamaecrista* lineages in which leaf production are relatively more expensive (i.e. perennials). Such relatively higher investment is associated with the production of larger EFNs secreting more sugar-rich nectar. The Optimal Defense Theory (McKey 1974; Zangerl & Rutledge 1996) was originally proposed to explain how plants allocate defenses among different organs within an individual, predicting that tissues with higher value or construction cost receive stronger protection. Although our study does not address within-plant allocation, the same rationale can be applied across species. In this context, we found that species with leaves with high LMA tend to evolve larger EFNs,

indicating greater investment in biotic defense. This pattern contrasts with acquisitive species, which generally have less costly leaves and reduced investment in EFNs.

The indirect evolutionary relationship between plant life form and EFN size, mediated by LMA, reveals a core adaptive axis connecting life history strategies with leaf phenotypes. The focal *Chamaecrista* lineage evolved in South America's dry seasonal ecosystems, where evolutionary shifts in life form, from slow-growing perennials to short-lived annuals, directly correspond with niche differentiation across resource gradients (Prochazka et al. 2024). Consequently, the evolution of life form-LMA relationship reflects correlated changes in resource use/acquisition strategies and foliar investment, aligning with plant economic spectrum theory (Díaz et al. 2016). We emphasize that GDB theory predicts moderately resource-limited environments favor slow-growing, high-LMA plants with greater defense investment, contrasting with fast-growing plants in resource-rich environments (Herms & Mattson 1992). However, this prediction conflicts with our data, since *Chamaecrista* annual lineages evolved under lower resource availability (soil water/nitrogen), while perennials occupied more favorable niches (Prochazka et al. 2024). This apparent contradiction arises because annuals exploit efficiently favorable seasonal windows to complete rapid life cycles, reproducing within 4-5 months before senescence (Friedman, 2020). Thus, life form acts as an integrating trait directly linking resource use/acquisition strategies, foliar tissue investment, and defense allocation magnitude. This integration underscores the evolutionary significance of life form-foliar phenotype relationships, expanding understanding of pathways shaping plant defensive strategies.

The association between EFNs and water availability reveals a significant evolutionary pattern within *Chamaecrista*. We found a positive correlation between evolutionary changes in EFN size and water availability, suggesting that physiological costs of extrafloral nectar production influence EFN evolution. Environments with greater water availability reduce nectar production costs (Heil 2011; Delgado et al. 2014; Pringle 2016), favoring the emergence and persistence of larger, more active nectaries. Conversely, arid environments impose severe water constraints that intensify physiological *trade-offs*: increased nectar production costs reduce net benefits from ant mutualisms (Nogueira et al. 2012b). Then, in arid environments, natural selection has favored smaller nectaries that maintain net interaction benefits while minimizing costs. Our results further demonstrate that higher niche water availability relaxes evolutionary constraints on EFNs. While only small nectaries evolve under water-limited conditions, both large and small EFNs can evolve and persist in high water availability niches. The best-supported evolutionary model also indicates coordinated evolution among water availability, LMA, and EFN size. This integration may reflect

hydraulic adaptations. High-LMA leaves exhibit well-developed vascular tissues with reduced hydraulic vulnerability (Nardini et al. 2012; Villagra et al. 2013), facilitating the efficient resource transport to extrafloral nectar production without compromising the plant's water balance. Thus, the coordinated evolution of LMA, water-rich niches, and EFNs indicates natural selection simultaneously shaped multiple traits, promoting coordinated functionality that optimize plant fitness against environmental constraints.

We detected correlated evolution between EFN size and secretion traits in *Chamaecrista*, consistent with allometric expectations: lineages that evolved larger nectaries also evolved greater secretion volume with higher sugar content, aligning with prior evidence that larger structures support higher secretory activity (Baker-Méio and Marquis 2012; Alencar et al. 2023). Furthermore, we identified a functional size threshold for reliable ant attendance in *Chamaecrista*. Species that evolved EFNs larger than 0.5 mm² and secrete at least 1 µL of nectar have $\geq 70\%$ probability of ant visitation, indicating a species that evolved a higher plant attractiveness to ants. Despite reduced nectar production costs, species below this threshold fail to attract sufficient ants to function as an effective biotic defense, resulting in negligible benefits. This reinforces that defensive mutualisms require minimum functional investment, and selection acts not merely on EFN presence, but on their effectiveness in sustaining beneficial interactions depending on the evolution of nectar traits. Therefore, lineages with tiny EFNs, though often considered "functional" in the literature, may be rarely detected by ants, making them ecologically ineffective and, over evolutionary time, irrelevant to plant defense, with no impact on plant fitness.

Conclusions

Our findings reshape understanding of defensive mutualism evolution. Plant lineages that evolved conservative strategies, such as slow-growing perennials with high leaf mass per area, evolved stronger biotic defenses. There is coordinated evolution among plant traits, EFN size, and nectar features, which together shaped ant attractiveness during the diversification of *Chamaecrista*. Water availability in seasonally dry ecosystems also modulated the evolution of plant traits and biotic defenses: more humid habitats favored the evolution of stronger biotic defenses, whereas arid environments constrained their maintenance. In sum, the persistence of such mutualisms depends not only on ant-derived benefits but on evolutionary integration across the plant body, physiologically balancing nectar production costs against ant-visitational benefits. Demonstrating that multiple selective pressures act simultaneously on EFNs reveals how these interactions evolve and persist. Mutualism evolution cannot be reduced to isolated traits; it requires analyzing functional integration of ecological and

physiological characteristics. Thus, our study advances knowledge of defensive mutualism mechanisms and underscores the need for multi-trait evolutionary approaches to decipher how natural selection promotes and maintains different types of mutualisms.

References

- Alencar, C. L. da S., A. Nogueira, R. E. Vicente, and Í. A. C. Coutinho. 2023. Plant species with larger extrafloral nectaries produce better quality nectar when needed and interact with the best ant partners. *J. Exp. Bot.*
- Baker-Méio, B., and R. J. Marquis. 2012. Context-dependent benefits from ant–plant mutualism in three sympatric varieties of *Chamaecrista desvauxii*. *J. Ecol.* 100:242–252.
- Bronstein, J. L. 1994. Conditional outcomes in mutualistic interactions. *Trends Ecol. Evol.* 9:214–217.
- Bruneau, A. et al. 2008. Phylogenetic patterns and diversification in the caesalpinoid legumes. *Botany*. 86(7): 697–718.
- Cardon, M., Loot, G., Grenouillet, G. & Blanchet, S. (2011) Host characteristics and environmental factors differentially drive the burden and pathogenicity of an ectoparasite: a multilevel causal analysis. *Journal of Animal Ecology*, **80**, 657–667
- Cipollini, D., D. Walters, and C. Voelckel. 2017. Costs of Resistance in Plants: From Theory to Evidence. Pp. 263–307 in *Annual Plant Reviews* online. Wiley.
- Conceição, A. de S., L. P. de Queiroz, G. P. Lewis, M. J. G. de Andrade, P. R. M. de Almeida, A. S. Schnadelbach, and C. van den Berg. 2009. Phylogeny of *Chamaecrista* Moench (Leguminosae-Caesalpinioideae) based on nuclear and chloroplast DNA regions. *Taxon* 58:1168–1180. International Association for Plant Taxonomy.
- Cornelissen, J. H. C., S. Lavorel, E. Garnier, S. Díaz, N. Buchmann, D. E. Gurvich, P. B. Reich, et al. 2003. A handbook of protocols for standardised and easy measurement of plant functional traits worldwide. *Aust. J. Bot.*
- Cota, M. M. T., J. G. Rando, D. Cardoso, A. de S. Conceição, C. Snak, and L. P. de Queiroz. 2025. Circumscribing *Chamaecrista* section *Baseophyllum* (Caesalpinioideae, Leguminosae) based on molecular data and morphology. *Bot. J. Linn. Soc.*
- Coutinho, Í. A. C., D. M. T. Francino, A. A. Azevedo, and R. M. S. A. Meira. 2012. Anatomy of the extrafloral nectaries in species of *Chamaecrista* section *Absus* subsection *Baseophyllum* (Leguminosae, Caesalpinioideae). *Flora* 207:427–435.
- Coutinho, Í. A. C., D. M. T. Francino, V. C. Dalvi, and R. M. Strozi Alves Meira. 2022. Extrafloral nectary development, characterization and secretion in *Chamaecrista debilis* and *C. desvauxii* var. *langsдорffii* (Leguminosae, Caesalpinioideae). *Nordic J. Bot.*
- Dafni, A., Kevan, P.G. and Husband, B.C. (2005) **Plant-Pollinator Interface**. In Potts, S.G., Ed., *Practical Pollination Biology*, Enviroquest, Ontario.
- Delgado, M. N., S. N. Bão, L. I. V. Amaral, D. R. Rossatto, and H. C. de Moraes. 2014. Extrafloral nectary morphology and the role of environmental constraints in shaping its traits in a common Cerrado shrub (*Maprounea brasiliensis* A. St.-Hill.: Euphorbiaceae). *Rev. Bras. Bot.* 37:495–504.
- Díaz, S., J. Kattge, J. H. C. Cornelissen, I. J. Wright, S. Lavorel, S. Dray, B. Reu, M. Kleyer, C. Wirth, I. Colin Prentice, E. Garnier, G. Bönisch, M. Westoby, H. Poorter, P. B.

Reich, A. T. Moles, J. Dickie, A. N. Gillison, A. E. Zanne, J. Chave, S. Joseph Wright, S. N. Sheremet Ev, H. Jactel, C. Baraloto, B. Cerabolini, S. Pierce, B. Shipley, D. Kirkup, F. Casanoves, J. S. Joswig, A. Günther, V. Falczuk, N. Rüger, M. D. Mahecha, and L. D. Gorné. 2016. The global spectrum of plant form and function. *Nature* 529:167–171. Nature Publishing Group.

Felsenstein, J. 1985. Phylogenies and the comparative method. – *Am. Nat.* 125: 1–15.

Friedman J. 2020. The evolution of annual and perennial plant life histories: ecological correlates and genetic mechanisms. *The Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 51: 461–481.

Gonzalez-Voyer, A., and A. von Hardenberg. 2014. An Introduction to Phylogenetic Path Analysis. Pp. 201–229 in *Modern Phylogenetic Comparative Methods and Their Application in Evolutionary Biology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.

Hansen, T. F. 1997. Stabilizing selection and the comparative analysis of adaptation. *Evolution* (N Y) 51:1341–1351.

Hardenberg, A. von, and A. Gonzalez-Voyer. 2013. Disentangling evolutionary cause-effect relationships with phylogenetic confirmatory path analysis. *Evolution* (N Y) 67:378–387.

Heil, M. 2011. Nectar: Generation, regulation and ecological functions. *Trends Plant Sci.*

Heil, M. and McKey, D. 2003. Protective ant-plant interactions as model systems in ecological and evolutionary research. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 34(1), pp.425-553.

Herendeen, P. S., A. Bruneau, and G. P. Lewis. 2003. Phylogenetic relationships in caesalpinoid legumes: a preliminary analysis based on morphological and molecular data. Pp. 37–62 in B. B. Klitgaard and A. Bruneau, eds. *Advances in Legume Systematics, Part 10*. Royal Botanic Gardens, Kew, UK.

Hermis, D. A., and W. J. Mattson. 1992. The dilemma of plants: to grow or defend. *Q. Rev. Biol.* 67:283–335.

Hermis, D. A., and W. J. Mattson. 1992. The dilemma of plants: to grow or defend. *Q Rev Biol* 67:283–335.

Kiers, E. T. P. T. M., A. R. Ives, J. F. Bruno, and J. L. Bronstein. 2010. Mutualisms in a changing world: An evolutionary perspective. *Ecol. Lett.* 13:1459–1474.

Leal, L. C., A. Nogueira, and P. E. C. Peixoto. 2023. Which traits optimize plant benefits? Meta-analysis on the effect of partner traits on the outcome of an ant–plant protective mutualism. *J. Ecol.* 111:263–275.

Leal, L. C., and P. E. C. Peixoto. 2017. Decreasing water availability across the globe improves the effectiveness of protective ant–plant mutualisms: a meta-analysis. *Biol. Rev.* 92:1785–1794.

Leal, L.C., Silva, A.V., Melati, B., Prochazka, L.S., Souza, D.D. and Nogueira, A. Ant-plant protection mutualisms mediated by extrafloral nectar: a macroecological analysis of outcomes in relation to precipitation. 2025. Editora Springer.

Marazzi, B., E. Conti, M. J. Sanderson, M. M. McMahon, and J. L. Bronstein. 2013. Diversity and evolution of a trait mediating ant–plant interactions: insights from extrafloral nectaries in *Senna* (Leguminosae). *Ann. Bot.* 111:1263–1275.

McKey, D. 1974. Adaptive patterns in alkaloid physiology. *Am. Nat.* 108.

Nardini, A., G. Pedà, and N. La Rocca. 2012. Trade-offs between leaf hydraulic capacity and drought vulnerability: morpho-anatomical bases, carbon costs and ecological consequences. *New Phytol.* 196:788–798.

Nascimento, E. A., and K. Del-Claro. 2010. Ant visitation to extrafloral nectaries decreases herbivory and increases fruit set in *Chamaecrista debilis* (Fabaceae) in a Neotropical savanna. *Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 205:754–756.

Nogueira, A., E. Guimarães, S. R. Machado, and L. G. Lohmann. 2012a. Do extrafloral nectaries present a defensive role against herbivores in two species of the family Bignoniaceae in Neotropical savannas? *Plant Ecol.* 213:289–301.

Nogueira A, Rey PJ, Alcántara JM, Feitosa RM, Lohmann LG. 2015. Geographic mosaic of plant evolution: extrafloral nectary variation mediated by ant and herbivore assemblages. *PLoS One* 10, e0123806.

Nogueira, A., F. B. Baccaro, L. C. Leal, P. J. Rey, L. G. Lohmann, and J. L. Bronstein. 2020. Variation in the production of plant tissues bearing extrafloral nectaries explains temporal patterns of ant attendance in Amazonian understorey plants. *J. Ecol.* 108:1578–1591.

Nogueira, A., P. J. Rey, and L. G. Lohmann. 2012b. Evolution of extrafloral nectaries: adaptive process and selective regime changes from forest to savanna. *J. Evol. Biol.* 25:2325–2340.

Nogueira, A., P. J. Rey, J. M. Alcántara, and L. G. Lohmann. 2016. Evidence of between-population differences in natural selection on extrafloral nectaries of the shrub *Anemopaegma album* (Bignoniaceae). *Botany* 94:201–213.

O'Dowd D. J. 1979. Foliar nectar production and ant activity on a neotropical tree, *Ochroma pyramidale*. *Oecologia* 43:233–248

Pagel, M. Inferring the historical patterns of biological evolution. *Nature* **401**, 877–884 (1999).

Poorter, H., Ü. Niinemets, L. Poorter, I. J. Wright, and R. Villar. 2009. Causes and consequences of variation in leaf mass per area (LMA): a meta-analysis. *New Phytol.* 182:565–588.

Poorter, H., Ü. Niinemets, L. Poorter, I. J. Wright, and R. Villar. 2009. Causes and consequences of variation in leaf mass per area (LMA): A meta-analysis. *New Phytologist* 182:565–588.

Pringle, E. G. 2016. Integrating plant carbon dynamics with mutualism ecology. *New Phytol.* 210:71–75.

Prochazka, L. S., S. Alcantara, J. G. Rando, T. Vasconcelos, R. C. Pizzardo, and A. Nogueira. 2024. Resource availability and disturbance frequency shape evolution of plant life forms in Neotropical habitats. *New Phytol.* 242:760–773.

Rando, J. G., A. R. Zuntini, A. S. Conceição, C. van den Berg, J. R. Pirani, and L. P. de Queiroz. 2016. Phylogeny of *Chamaecrista* ser. *Coriaceae* (Leguminosae) unveils a lineage recently diversified in Brazilian campo Rupestre vegetation. *Int J Plant Sci* 177:3–17. University of Chicago Press.

Rando, J. G., M. M. T. Cota, A. G. Lima, R. L. C. Bortoluzzi, B. Marazzi, and A. S. Conceição. 2024. Tribe Cassieae. Pp. 83–102 in A. Bruneau, L. P. Queiroz, and Ringelberg J. J., eds. *Advances in Legume Systematics 14. Classification of Caesalpinioideae. Part 2: Higher-level classification*. PhytoKeys.

Revell, L. J. 2012. phytools: An R package for phylogenetic comparative biology (and other things). *Methods Ecol Evol* 3:217–223.

Rhoades, D. F. 1979. Evolution of plant chemical defense against herbivores. Pp. 3–54 in G. A. Rosenthal and D. H. Janzen, eds. *Herbivores: their interaction with secondary plant metabolites*. Academic Press, New York.

Rico-Gray, V., and P. S. Oliveira. 2007. *The Ecology and Evolution of Ant–Plant Interactions*. University of Chicago Press, Chicago, IL.

Rosenthal, J. P., and R. Dirzo. 1997. Effects of life history, domestication and agronomic selection on plant defence against insects: Evidence from maizes and wild relatives. *Evol Ecol* 337–355.

Rutter, M. T., and M. D. Rausher. 2004. Natural selection on extrafloral nectar production in *Chamaecrista fasciculata*: the costs and benefits of a mutualism trait. *Evolution* 58:2657–2668.

Sachs, J. L., and E. L. Simms. 2006. Pathways to mutualism breakdown. *Trends Ecol. Evol.*

Silva, M. S., Í. A. C. Coutinho, M. N. Araújo, and R. M. S. A. Meira. 2017. Morphoanatomy of nectaries of *Chamaecrista* sections *Chamaecrista*, *Caliciopsis* and *Xerocalyx* (Leguminosae: Caesalpinioideae). *Acta Bot. Bras.* 31:445–458.

Souza, A. de S., G. P. Lewis, and M. J. da Silva. 2021. A new infrageneric classification of the pantropical genus *Chamaecrista* (Fabaceae: Caesalpinioideae) based on a comprehensive molecular phylogenetic analysis and morphology. *Botanical Journal of the Linnean Society* XX:1–46.

Thiers, B. M. (updated continuously). *Index Herbariorum*.
<https://sweetgum.nybg.org/science/ih/>

van der Bijl, W. 2018. phylopath: Easy phylogenetic path analysis in R. *PeerJ* 2018. PeerJ Inc

Villagra, M., P. I. Campanello, S. J. Bucci, and G. Goldstein. 2013. Functional relationships between leaf hydraulics and leaf economic traits in response to nutrient addition in subtropical tree species. *Tree Physiol.* 33:1308–1318.

Weber, M. G., and A. A. Agrawal. 2014. Defense mutualisms enhance plant diversification. *Evolution* 111.

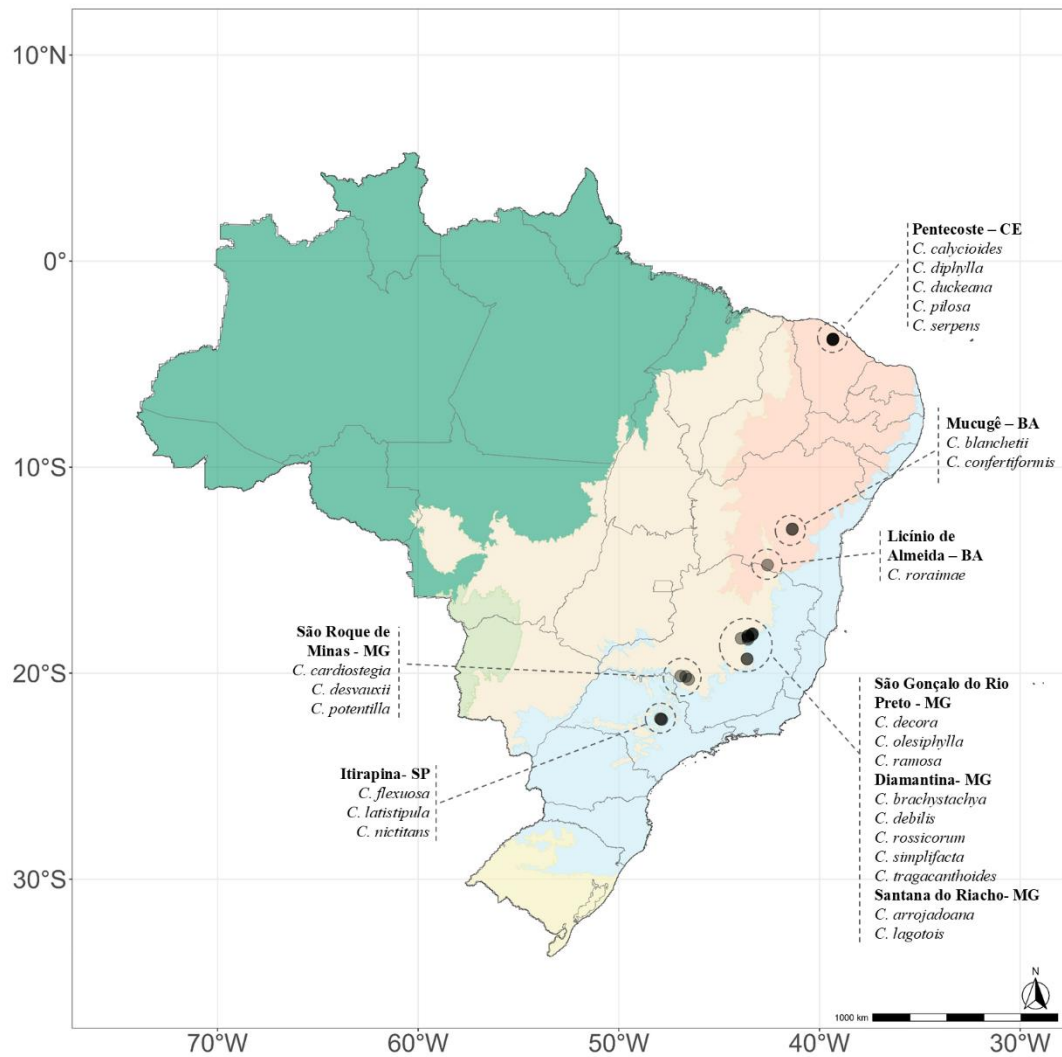
Weber, M. G., and K. H. Keeler. 2013. The phylogenetic distribution of extrafloral nectaries in plants. *Ann Bot* 111:1251–1261.

Zangerl, A. R., and C. E. Rutledge. 1996. The probability of attack and patterns of constitutive and induced defense: a test of optimal defense theory. *Am. Nat.* 147:599–608.

Zhu, J., L. Sun, C. He, Q. Cai, J. Zhu, and C. Ji. 2024. Large and thin leaves are compromised more by chewers. *Ecosphere* 15. John Wiley and Sons Inc.

Supplementary Material

Supplementary Material S1: Map of the field-sampled populations where morphological, nectar, and plant–ant interaction data were collected. Each point represents a *Chamaecrista* populations included in the analyses. Different color in the maps represent Brazilian biomes.



Supplementary Material S2: Phylogenetic path analysis among possible predictor variables of nectary size.

The image shows the three competing y models for which we tested the evolutionary correlation between possible predictors of biotic defense (extrafloral nectary size) using phylogenetic path analysis. In all models, we considered the existence of a direct relationship between water availability and plant life form, as this pattern was previously detected in a previous study with the same plant group (Prochazka et al. 2024).

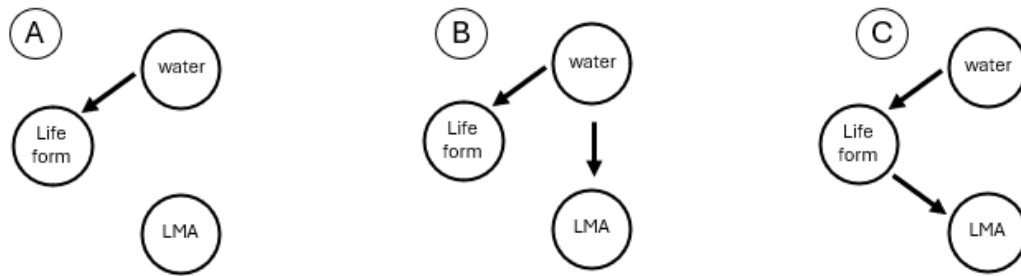
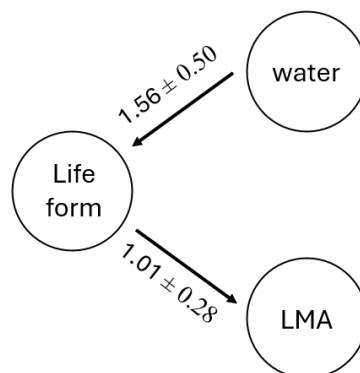


Table S2: Results of the phylogenetic path analysis. Model C showed the best fit to the data ($\Delta \text{CICc} = 0$). For each model, we report the number of parameters (k), conditional independencies tested (q), C-statistic (C) with p-value, small-sample corrected information criterion (CICc), ΔCICc (difference from best model), relative likelihood (l), and model weight (w).

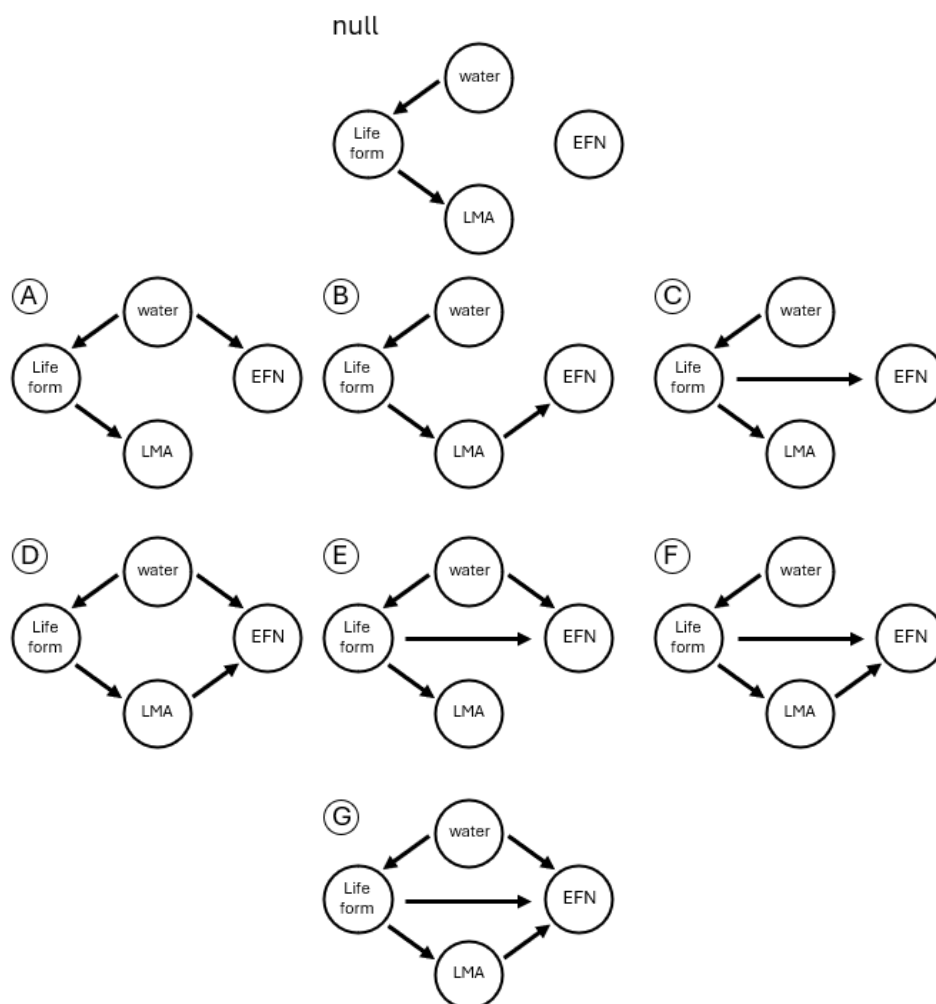
model	k	q	C	p-value	CICc	ΔCICc	l	w
C	1	5	0.19	0.91	11.5	0	1.000	0.994
B	1	5	11.25	0.00	22.6	11.1	0.004	0.004
A	2	4	15.46	0.00	24.3	12.8	0.002	0.002

Figure S2: Coefficients estimated for the model with the best fit to the data (Model C):



Supplementary Material S3: Competing causal models used in the phylogenetic path analysis testing relationships between predictor variables and nectary size.

Figure S3: Competing causal models for phylogenetic path analysis. Models are ordered from simplest to most complex: Null: No variables linked to nectary size; a–c: Single-predictor models; d–f: Two-predictor models; and g: Full three-predictor model.



Supplementary Material S4: Phylogenetic path analysis among possible predictor variables of nectar traits.

The image shows the four competing models for which we tested the evolutionary correlation between nectar traits using phylogenetic path analysis.

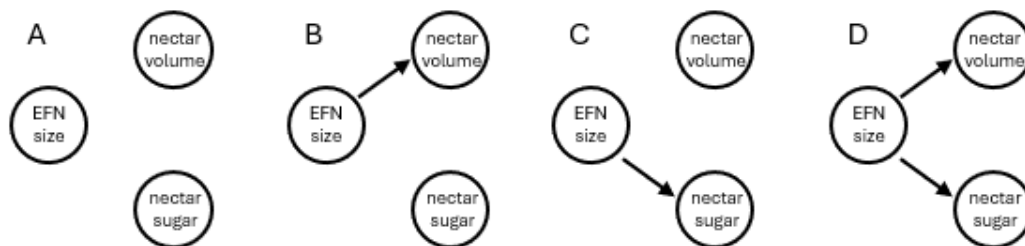
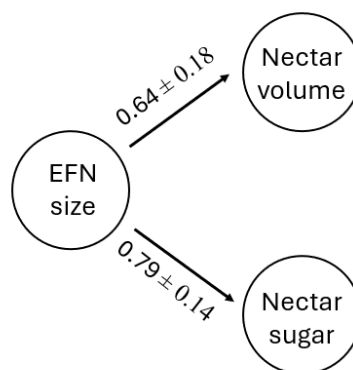


Table S4: Results of the phylogenetic path analysis. Model D showed the best fit to the data ($\Delta \text{CICc} = 0$). For each model, we report the number of parameters (k), conditional independencies tested (q), C-statistic (C) with p-value, small-sample corrected information criterion (CICc), ΔCICc (difference from best model), relative likelihood (l), and model weight (w).

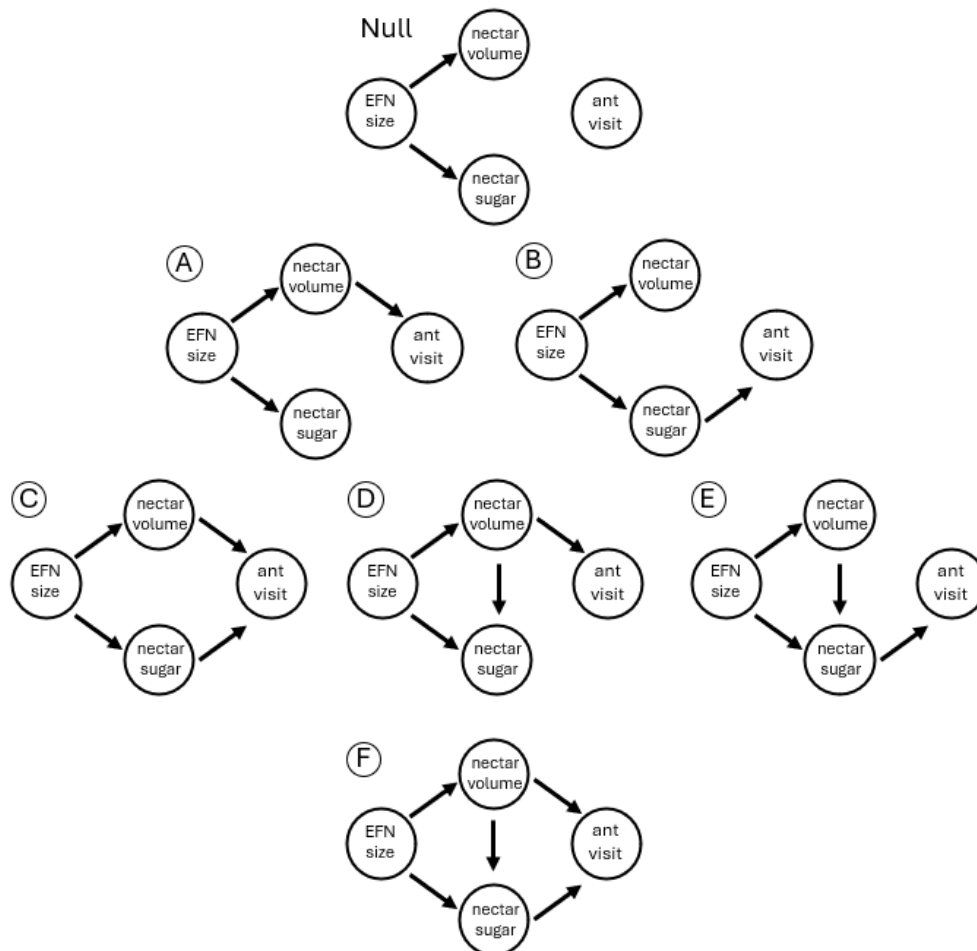
model	k	q	C	p	CICc	ΔCICc	l	w
D	1	5	24	6.14E-06	38	0	1.00E+00	9.89E-01
C	2	4	36.6	2.21E-07	47.1	9.06	1.08E-02	1.06E-02
B	2	4	45.9	2.58E-09	56.4	18.4	1.01E-04	1.00E-04
A	3	3	68.3	8.98E-13	75.7	37.74	6.37E-09	6.31E-09

Figure S4: Coefficients estimated for the model with the best fit to the data (Model D):



Supplementary Material S5: Competing causal models used in the phylogenetic path analysis testing relationships between nectar traits and ant visitation.

Figure S5: Competing causal models for phylogenetic path analysis. Models are ordered from simplest to most complex: Null: No variables linked to ant visitation; a–b: Single-nectar-trait models; c: Two-nectar-trait model; d–e: Single-trait models with causal link between nectar volume and sugar secretion; and f: Two-trait model with causal link between nectar volume and sugar secretion.



CAPÍTULO 3

Evolução divergente do mutualismo planta-bactéria em uma linhagem de leguminosas: Como diferentes estratégias funcionais moldam a evolução da nodulação radicular?

Evolução divergente do mutualismo planta-bactéria em uma linhagem de leguminosas: Como diferentes estratégias funcionais moldam a evolução da nodulação radicular?

Resumo

Os mutualismos nutricionais entre plantas e bactérias fixadoras de nitrogênio desempenham papel fundamental no sucesso ecológico e evolutivo das leguminosas. Modelos teóricos indicam que o investimento nesse tipo de simbiose mutualista depende do balanço entre os benefícios nutricionais recebidos e os custos fisiológicos associados, variando conforme estratégias ecológicas e fisiológicas das plantas e contextos ambientais. Neste estudo, investigamos a evolução da intensidade da nodulação radicular em uma linhagem do gênero *Chamaecrista*, ocorrentes predominantemente em habitats abertos e sazonais da América do Sul. Testamos se linhagens com diferentes formas de vida evoluíram diferentes níveis de investimento simbiótico com as bactérias fixadoras de nitrogênio em resposta a demandas nutricionais e estratégias funcionais específicas. A partir dos métodos comparativos filogenéticos identificamos que os ótimos fenotípicos para a nodulação divergem entre as formas de vida: espécies anuais evoluíram elevada intensidade de nodulação associada a alto teor de nitrogênio foliar e baixo LMA, enquanto espécies perenes rebrotantes evoluíram nodulação reduzida, folhas com baixo nitrogênio e alto LMA. Surpreendentemente, espécies perenes não rebrotantes evoluíram alta intensidade de nodulação associados a um menor teor de nitrogênio foliar. Nossos resultados indicam que a nodulação não responde a uma única pressão seletiva, mas sim a múltiplos regimes seletivos, moldados por interações complexas entre metabolismo, estratégias de alocação de recursos e limitações ambientais. Ao evidenciar como diferentes estratégias funcionais podem modular o investimento simbiótico ao longo do tempo evolutivo, contribuímos para a compreensão dos processos macroevolutivos que regulam a manutenção e diversificação dos mutualismos nutricionais ao longo da história evolutiva das plantas, especialmente das leguminosas.

Palavras-chave: espectro econômico das plantas, trade-offs evolutivos, simbiose

Introdução

Mutualismos são interações entre espécies que conferem benefícios recíprocos, contribuindo para o sucesso ecológico e evolutivo dos parceiros envolvidos (Bronstein 1994). Embora os mutualismos sejam caracterizados por seus efeitos positivos, elas também envolvem custos metabólicos associados à construção de estruturas especializadas, ao fornecimento de recursos ao parceiro e à manutenção da interação (Bronstein 2001; Holland et al. 2002; Sachs and Simms 2006). No caso das plantas, os recursos fornecidos para o estabelecimento e manutenção dos mutualismos são carboidratos derivados da fotossíntese (Pringle 2016). Nesse sentido, o investimento em mutualismos pode ser interpretado como uma dimensão adicional da alocação de recursos pelas plantas, competindo com outras funções essenciais, como crescimento, reprodução e defesa (Deyn 2017). Espera-se, portanto, que a seleção natural atue para maximizar os benefícios líquidos das interações mutualistas, favorecendo o maior investimento em contextos nos quais os recursos ou serviços obtidos compensem o custo energético de manter a simbiose (Sachs and Simms 2006; Kiers et al. 2010; Leigh 2010). Assim, a evolução dos mutualismos em plantas pode ser moldada por restrições energéticas, pela disponibilidade ambiental de recursos e pelas estratégias ecológicas no uso e alocação de recursos pela planta.

Os mutualismos de nutrição entre plantas e bactérias fixadoras de nitrogênio são ecologicamente significativos, sendo responsáveis por grande parte do nitrogênio reativo disponível nos ecossistemas terrestres (Vitousek et al. 2002; Herridge 2008). Nessa interação, as bactérias convertem o nitrogênio atmosférico (N_2) que está indisponível e é inerte para quase a totalidade de vida na Terra, inclusive para as plantas, em compostos nitrogenados reativos, que podem ser absorvidos e utilizados pelas plantas para diferentes funções metabólicas. Concomitantemente, a planta hospedeira fornece carbono e um ambiente fisiologicamente estável para as bactérias dentro dos nódulos radiculares (Vance 2001; Oldroyd and Dixon 2014). Apesar dessa simbiose aumentar significativamente a aptidão vegetal (Friesen et al. 2011), ela é uma interação energeticamente custosa, podendo consumir de 20-30% dos fotoassimilados produzidos pela planta (Warembourg et al. 1982; Peoples et al. 1989). Assim, espera-se que esses mutualismos sejam alvos de regulação e seleção, ajustando o investimento com base na eficiência dos simbiossiontes e na disponibilidade de recursos no solo (Vitousek et al. 2002; Kiers et al. 2003; Zheng et al. 2023). Como consequência, ao longo do tempo evolutivo, diferentes soluções podem ter sido encontradas pelas plantas para explorar essas interações mutualistas de acordo com seu metabolismo e restrições ambientais.

A teoria do mercado biológico (Noë et al. 1994) prevê que o investimento em simbiose mutualista aumente quando o recurso oferecido pelo parceiro simbiote é escasso no ambiente. Modelos matemáticos aplicados ao mutualismo de nutrição reforçam essa expectativa ao indicar que, sob baixa disponibilidade de nitrato no solo, as plantas tendem a aumentar os níveis de interação com bactérias fixadoras de nitrogênio (Kobayashi et al. 2021). Evidências empíricas corroboram essas previsões, por exemplo, uma metanálise indicou que a adição de nitrogênio no solo inibe a fixação biológica de nitrogênio pela comunidade de microrganismos diazotróficos (Zheng et al. 2023). Além disso, as plantas penalizam ativamente bactérias que fixam menos nitrogênio, reduzindo o suprimento de carboidratos para as bactérias ineficientes e fortalecendo as interações com as bactérias mais eficientes (Kiers et al., 2003). Assim, espera-se que o mutualismo de nutrição entre plantas e bactérias fixadoras de nitrogênio evolua como um sistema de troca condicional, no qual o benefício recebido pela planta determine o nível de investimento na simbiose mutualista.

Devido ao alto custo metabólico associado aos simbiontes nutricionais, o grau de investimento nessas interações pode ter sido selecionado em conjunto com as estratégias funcionais das plantas para aquisição e uso de recursos. O espectro econômico de aquisição e conservação de recursos (Wright et al. 2004; Díaz et al. 2016) descreve um contínuo no qual as espécies vegetais possuem diferentes combinações de características, refletindo respostas adaptativas a condições ambientais contrastantes. Em um extremo, espécies aquisitivas possuem características associadas a crescimento rápido, alta taxa fotossintética e elevada demanda por nutrientes. No outro extremo, espécies conservativas possuem características que favorecem a retenção e o uso eficiente de recursos (Wright et al. 2004; Díaz et al. 2016). Esse espectro funcional se conecta à teoria de história de vida, na qual diferentes estratégias ecológicas evoluíram em resposta a pressões seletivas associadas a restrições energéticas e nutricionais, levando a padrões divergentes de alocação de recursos entre crescimento, reprodução e defesa (Grime 1977; Herms and Mattson 1992; Craine et al. 2012). Dentro desse contexto, o investimento em mutualismos abaixo do solo pode ser interpretado como uma dimensão adicional dos *trade-offs* associados a alocação de recursos em diferentes funções das plantas. Assim, as estratégias funcionais podem moldar tanto a demanda por nitrogênio quanto a dependência de mutualismos para obtê-lo (Bergmann et al. 2020). Modelos conceituais indicam que espécies com estratégias conservativas invistam mais em mutualismos abaixo do solo como uma forma de aumentar sua eficiência no uso de recursos, especialmente em habitats de baixa fertilidade (Deyn 2017). Por outro lado, em espécies ruderais, nas quais a seleção favoreceu alocação rápida e intensa em reprodução, o modelo prevê a supressão do investimento em interações mutualistas custosas (Deyn 2017). Ainda

que conceitualmente robusta, esse modelo carece de validação empírica abrangente sobre como diferentes estratégias de história de vida estão associadas com o investimento em mutualismo nutricionais.

Por outro lado, modelos matemáticos fornecem uma perspectiva alternativa ao considerar que o investimento em mutualismos nutricionais é regulado pela capacidade fotossintética das plantas e pela disponibilidade de nitrogênio no solo (Kobayashi et al. 2021). Nesse modelo, a nodulação é tratada como uma característica adaptativa, sujeito à otimização conforme o balanço entre custo metabólico e o benefício nutricional em manter a associação com as bactérias fixadoras de nitrogênio. Nesse sentido, o investimento simbiótico está positivamente associado com a limitação de nitrogênio no solo, mas também depende da capacidade da planta em sustentar o custo da simbiose via taxa fotossintética (Kobayashi et al. 2021). Isso implica que, em ambientes com alta incidência luminosa, plantas de crescimento rápido e metabolismo elevado podem investir muito mais em nodulação e na fixação biológica de nitrogênio. Além disso, mesmo espécies de metabolismo mais lento podem manter mutualismos relevantes em condições de limitação extrema de nitrogênio, como resposta à baixa disponibilidade de nitrogênio no solo (Kobayashi et al. 2021). Dados empíricos sustentam esse modelo. Por exemplo, plantas anuais, com ciclo de vida curto e alta taxa fotossintética são muito dependentes do mutualismo com bactérias fixadoras de nitrogênio para garantir o seu crescimento e reprodução (Souza et al. 2025). Por outro lado, espécies conservativas priorizam a retenção e o uso eficiente dos nutrientes, podendo investir menos em mutualismos nutricionais e mais na construção do corpo vegetal (Bergmann et al. 2020). Assim, diferentes trajetórias evolutivas podem ter conduzido a padrões contrastantes de investimento neste tipo de mutualismo, resultantes da interação entre estratégias ecológicas, eficiência fotossintética e disponibilidade de nutrientes no solo.

Neste estudo, investigamos como a intensidade da interação com bactérias fixadoras de nitrogênio evoluiu em uma linhagem de leguminosas que ocorre predominantemente em ambientes sazonais mais secos e abertos da América do Sul. Especificamente, investigamos se a intensidade da simbiose está associada a mudanças evolutivas nas estratégias ecológicas das plantas, refletindo adaptações às pressões ambientais e às demandas fisiológicas distintas entre as linhagens. Para isso, primeiro testamos o pressuposto de que linhagens que evoluíram formas de vida distintas (Prochazka et al. 2024) evoluíram combinações de características funcionais únicas de acordo com o espectro econômico das plantas: plantas anuais investiriam em folhas mais baratas e com maior concentração de nutrientes, indicando alta taxa fotossintética e metabolismo acelerado; enquanto plantas perenes mais conservativas investiriam em folhas mais custosas, com menor concentração de nutrientes, indicando baixa

taxa fotossintética e metabolismo moderado. Subsequentemente, nós testamos se a evolução divergente entre as formas de vida associadas as características funcionais, determinaram a evolução na intensidade da interação com bactérias fixadoras de nitrogênio. Com base nas diferenças metabólicas e na demanda por nitrogênio entre formas de vida, propomos que espécies anuais, caracterizadas por ciclo de vida curto, metabolismo acelerado e ocorrência em solos pobres em nitrogênio, evoluíram um maior investimento na simbiose mutualista com bactérias fixadoras de N. Essa adaptação é uma resposta direta a pressões seletivas decorrentes de sua alta demanda nutricional por nitrogênio. Em contraste, espécies perenes de crescimento rápido, com maior desenvolvimento da parte aérea e demanda intermediária por nutrientes, evoluíram níveis simbióticos moderados, inferiores aos das anuais. Por fim, linhagens perenes conservativas, com crescimento lento, baixa taxa fotossintética e reduzida demanda metabólica por nitrogênio, teriam evoluído interações simbióticas muito menos intensas ao longo do tempo evolutivo. Neste caso, a menor intensidade simbiótica é compatível com a baixa demanda nutricional por unidade de tempo e com a capacidade limitada de alocar carboidratos para a simbiose, devido à sua menor eficiência fotossintética. Assim, se a simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio é uma característica adaptativa que maximizou a obtenção de nutrientes, esperamos que a intensidade da interação reflita trajetórias evolutivas distintas entre as diferentes formas de vida e suas características funcionais.

Materiais e Métodos

Grupo de plantas focal

Chamaecrista (L.) Moench (Fabaceae) é um grupo diverso com aproximadamente 368 espécies (Rando et al. 2024), sendo um dos oito gêneros da subfamília Caesalpinioideae conhecidos por estabelecer simbioses com bactérias fixadoras de nitrogênio (LPWG 2017; Sprent et al. 2017). O gênero possui variação tanto na estrutura dos nódulos quanto na intensidade da colonização bacteriana (Naisbitt et al. 1992; Casaes et al. 2024). Além disso, as espécies de *Chamaecrista* diferem nos tipos de integração funcional estabelecidos com as bactérias simbióticas. Espécies com hábito de crescimento arbustivo ou subarbustivo, que se diversificaram em ambientes sazonais mais secos e abertos, evoluíram nódulos radiculares cujas células vegetais formam organelas especializadas chamadas simbiossomas (SYM) após o estabelecimento dos canais de infecção via pelos radiculares. Os simbiossomas permitem a intensa proliferação das bactérias nas células internas dos nódulos, resultando em uma maquinaria celular altamente integrada e eficiente para a fixação de N₂. Em contraste, espécies arbóreas, restritas a habitats florestais, mantêm nódulos com células que contêm

apenas os canais de infecção (FT), sem formação de simbiossomas e com baixa proliferação bacteriana intracelular, um tipo de simbiose menos integrada ao tecido vegetal (Casaes et al. 2024). A transição de FT para SYM parece estar associada à radiação do gênero para ambientes sazonais mais secos e abertos, sugerindo que a evolução de simbioses mais íntimas ocorreu junto com mudanças nas estratégias ecológicas das plantas, o que poderia ter favorecido a ocupação mais ampla do grupo em diferentes condições ambientais (Casaes et al. 2024).

Para este estudo focamos em uma linhagem dentro do gênero *Chamaecrista* que possui cerca de 142 espécies (section *Otophyllum*, *Baseophyllum* and *Chamaecrista*) e está amplamente distribuída especialmente nas áreas sazonais mais secas e abertas do Neotropico, incluindo o cerrado e a caatinga (Cota et al. 2025). Este grupo se diversificou nos últimos 40 milhões de anos e inclui espécies anuais e perenes representando diferentes estratégias ecológicas (Conceição et al. 2009; Rando et al. 2016; Souza et al. 2021; Prochazka et al. 2024; Cota et al. 2025). As espécies dessa linhagem fazem diferentes tipos de associação com bactérias fixadoras de nitrogênio (Naisbitt et al. 1992; Casaes et al. 2024) e evoluíram diferentes formas de vida que refletem estratégias contrastantes no uso e aquisição de recursos (Prochazka et al. 2024). Além disso, dentro dos ambientes abertos e sazonalmente secos, as espécies anuais tendem a ocupar ambientes com menor disponibilidade de nitrogênio, enquanto as perenes estão associadas a ambientes com maior disponibilidade desse recurso, refletindo a evolução conjunta entre nicho ambiental e forma de vida (Prochazka et al. 2024).

Filogenia do grupo focal

Para todas as análises utilizamos a filogenia mais recente, abrangente e calibrada no tempo (Rando et al. *em revisão*). A filogenia foi construída com dados de 231 espécies de *Chamaecrista* das quais 68 pertencem ao grupo focal deste estudo. O conjunto de dados incluiu 5.250 caracteres recuperados de cinco marcadores moleculares: o ITS e ETS nucleares, e o trnD-T plastidial, trnL-F e trnK-matK. A reconstrução considerou dois pontos de calibração: um ponto primário baseado em um registro fóssil do gênero *Senna* (Herendeen et al. 2003) e um ponto secundário da idade da tribo Cassiae com base em uma reconstrução filogenética anterior (Bruneau et al., 2008).

Para as análises macroevolutivas, podamos a filogenia para manter apenas as espécies do grupo focal (seções *Otophyllum*, *Baseophyllum* e *Chamaecrista*), e removemos as 17 espécies para as quais não havia dados completos das variáveis de interesse. Assim, as análises macroevolutivas foram realizadas com os dados de 51 espécies. Para incorporar a incerteza da reconstrução filogenética, utilizamos uma amostra de 100 árvores filogenéticas

extraídas da distribuição a posteriori da análise bayesiana disponíveis em Rando et al. (*em revisão*).

Descritores funcionais e simbióticos

Para investigar o pressuposto de que as formas de vida distinguem adequadamente as estratégias aquisitivas e conservativas ao longo do espectro econômico das plantas, e se essas estratégias estão associadas a evolução da interação com bactérias fixadoras de nitrogênio, combinamos dados foliares e radiculares obtidos em material herborizado e em populações naturais de espécies de *Chamaecrista*. As formas de vida foram utilizadas como proxy para estratégias ecológicas, integrando informações sobre aquisição, uso e alocação de recursos. Os descritores foliares incluíram o teor de nitrogênio foliar e a massa foliar por área (LMA). O conteúdo de nitrogênio foliar é uma característica funcional associada à atividade fotossintética (Wright et al. 2004; Reich 2014; Evans and Clarke 2019), uma vez que grande parte desse nitrogênio é alocada para a síntese de proteínas do aparato fotossintético, em especial a rubisco (Evans 1989), tornando o conteúdo foliar de nitrogênio um bom preditor da capacidade fotossintética das plantas (Evans and Clarke 2019). Por outro lado, o LMA reflete a estratégia de alocação de carbono das plantas (Poorter et al. 2009), valores de LMA elevados indicam alto investimento na construção foliar, típicos de estratégias conservativas, enquanto valores de LMA baixo estão associados a folhas menos robustas e de vida curta, características de estratégias aquisitivas (Poorter et al. 2009). O uso conjunto dessas métricas permite inferir como as espécies alocam recursos para a construção dos tecidos vegetativos, permitindo investigar se as formas de vida efetivamente refletem diferenças funcionais consistentes com estratégias aquisitivas e conservativas.

Os descritores radiculares e de interação simbiótica foram obtidos por amostragem padronizada em populações naturais e incluíram métricas associadas à massa de raiz e à intensidade da interação simbiótica com bactérias fixadoras de nitrogênio. Essa intensidade foi representada por diferentes métricas, como número e massa de nódulos. O uso integrado dos descritores foliares, radiculares e simbióticos permitiu testar se a evolução de diferentes formas de vida está associada a evolução de estratégias funcionais contrastantes e se a intensidade da simbiose com rizóbios evoluiu de forma coordenada com essas estratégias.

Classificação das formas de vida

A classificação da forma de vida das diferentes espécies de *Chamaecrista*, foram obtidos de Prochazka et al (2024). Originalmente os autores seguiram o sistema de Raunkiaer classificando as espécies em quatro formas de vida. No entanto, como caméfitas e fanerófitas

em *Chamaecrista* ocupam nichos ambientais semelhantes e compartilham estratégias ecológicas convergentes (Prochazka et al. 2024), nós agrupamos essas formas de vida em uma só, denominada perenes não rebrotantes. Para as espécies geófitas, adotamos a terminologia perenes rebrotantes (Bellingham and Sparrow 2000; Pausas et al. 2018), por melhor refletir a capacidade dessas plantas de rebrotar após distúrbios. Essa estratégia, sustentada por uma maior alocação de recursos em órgãos subterrâneos e pelo crescimento lento, caracteriza o padrão eco-fisiológico central desse grupo (Prochazka et al. 2024). Mantivemos a classificação das espécies terófitas como anuais.

Coleta de dados em material herborizado dos herbários

Para estimar a quantidade de nitrogênio foliar, nós utilizamos folhas retiradas de exsiccatas de espécies amostradas em quatro herbários e descritas em Prochazka et al. (*in prep.*, capítulo 2 desta tese). Ao todo, amostramos folhas de 83 indivíduos representando 51 espécies de *Chamaecrista* do grupo focal disponíveis na filogenia. As folhas foram previamente liofilizadas e depois trituradas até virarem pó. Em seguida, as amostras foram submetidas à análise elementar (Analisador Elementar Perkin Elmer 2400 Series II) para quantificação dos teores de carbono (C) e nitrogênio (N) foliar. A quantidade de nitrogênio foliar foi calculada a partir dos valores de concentração (%) obtidas pela análise elementar, e foi expressa como a razão entre a massa de nitrogênio (mg) por massa foliar (g). Essa métrica permite comparar a concentração de N entre espécies independentemente do tamanho foliar. Nós realizamos a análise elementar para cada folha duas vezes para que tivéssemos confiança na estimativa do nitrogênio foliar e reduzir a influência de erros analíticos que podem reduzir o valor estimado.

Os dados de massa foliar por área (LMA) foram extraídos de Prochazka et al. (*in prep.*, capítulo 2 desta tese), na qual folhas das mesmas plantas em que estimamos o nitrogênio foliar foram utilizadas para estimar o LMA. As folhas foram pesadas e posteriormente digitalizadas para cálculo da área foliar no software ImageJ. O LMA foi calculado como a razão entre massa por área foliar e foi expressa em g/m^2 .

Coleta de dados em populações naturais

Para a coleta de dados em populações naturais realizamos quatro expedições de campo que ocorreram entre abril de 2023 e janeiro de 2025, abrangendo quatro estados brasileiros (Bahia, Minas Gerais, Ceará e São Paulo). As coletas foram intencionalmente conduzidas entre o meio e o final da estação chuvosa, período em que a restrição hídrica é reduzida em todas as localidades amostradas, minimizando a possibilidade que a interação com bactérias

fixadora de nitrogênio estivesse limitada devido ao estresse hídrico. Para a amostragem das raízes e nodulação, as plantas no campo foram retiradas manualmente do local utilizando cavadeira manual e enxadas, de forma cuidadosa para manter o torrão de solo ao redor das raízes. Cada exemplar foi escavado com um diâmetro aproximado de 50 cm e profundidade entre 30 e 50 cm, garantindo que o sistema radicular permanecesse intacto (Figura 1a-b). O torrão de terra envolvendo as raízes foi cuidadosamente embrulhado com papel plástico, evitando a perda de solo e danos às raízes, mantendo o conjunto intacto para a retirada do torrão do buraco escavado e sua colocação em um saco plástico maior e mais resistente. Em seguida, o conjunto de raiz-solo foi transportado até o laboratório. A profundidade do solo amostrado foi variável dependendo se o solo era raso ou não, o que variou entre localidades. Para espécies muito grandes delimitamos a área do torrão conforme a identificação visual do caminho da raiz pelo solo. Essa abordagem minimizou a perda de raízes laterais, onde os nódulos são frequentemente encontrados. Diversas estratégias de amostragem dos nódulos e raízes no campo foram realizadas anteriormente em pilotos realizados por nosso grupo de pesquisa, mas a perda de nódulos se mostrou substancialmente maior quando o conjunto solo-raízes não são retirados de forma completa e lavados cuidadosamente em laboratório com o uso de peneiras. Portanto, após o trabalho de campo, lavamos o torrão cuidadosamente com água corrente sobre peneiras de malha fina (1mm), separando as raízes do solo sem perder nódulos que eventualmente se soltassem durante o processo de lavagem das raízes (Figura 1c-e).

Todos os nódulos visíveis foram contados e armazenados em sílica gel para desidratação rápida e posteriormente foram pesados em balanças analítica de no mínimo 3 casas decimais para obtenção da massa seca. Paralelamente, as raízes foram secas em estufa (60°C até massa constante) e pesadas para determinação da massa radicular de cada planta amostrada. Concomitantemente com a retirada do torrão também realizamos a coleta de folhas dos indivíduos amostrados. As amostras de folhas foram utilizadas posteriormente para estimar a conteúdo de nitrogênio foliar e o LMA. Para isso, utilizamos o mesmo procedimento aplicado para o material herborizado. Ao todo, amostramos 95 indivíduos representando 19 espécies de *Chamaecrista* (cinco indivíduos de cada espécie).

Reconstrução do estado ancestral das formas de vida

Para reconstruir a evolução das formas de vida em *Chamaecrista*, adotamos uma abordagem Bayesiana com mapeamento estocástico de caracteres (SIMMAP; Bollback, 2006). Primeiramente, avaliamos qual modelo macroevolutivo melhor explicava as transições entre as três formas de vida usando a função 'corHMM' (pacote CORHMM; (Boyko and

Beaulieu 2021)). Testamos três modelos alternativos de taxas de transição: ER (taxas iguais), SYM (taxas simétricas) e ARD (todas as taxas diferentes). A seleção do modelo com melhor ajuste foi realizada comparando os valores de AICc. O modelo com melhor ajuste foi o SYM e por isso ele foi utilizado para reconstruir o estado ancestral das formas de vida. A reconstrução do estado ancestral foi realizada utilizando a função 'make.simmap' (pacote phytools; (Revell 2012). Geramos 10 reconstruções para a árvore de consenso e, também geramos uma reconstrução para cada uma das 100 árvores filogenéticas alternativas para incorporar a incerteza filogenética em nossas análises.



Figura 1: Procedimentos realizado durante o trabalho de campo para a coleta e amostragem de nódulos radiculares e diversidade da estrutura dos nódulos encontrado em espécies de *Chamaecrista*. A: buracos realizados para retirada do sistema radicular junto com o torrão de terra em indivíduos de *C. diphylla*, uma espécie anual; B: Torrão com o sistema radicular de *C. cardiostegia*: uma espécie perene rebrotante. C: indivíduos de *C. diphylla* após a lavagem das raízes em peneiras de malha fina. D-E: Diversidade dos nódulos radiculares em diferentes espécies de *Chamaecrista*. D: *C. aristata* E: *C. nictitans* F: *C. rossicorum*, G: *C. lagotois* H: *C. choriophylla* I: *C. aristata*

Análises filogenéticas comparativas

Para o teste de nossos pressupostos e hipóteses combinamos modelos de regressão filogenética (PGLS – *phylogenetic generalized least squares*) e seleção de modelos de

evolução fenotípica por máxima verossimilhança. As análises de PGLS foram utilizadas para testar a correlação evolutiva entre variáveis contínuas descrevendo o fenótipo das plantas (e.g., LMA e conteúdo de nitrogênio foliar), incorporando a covariância filogenética via estrutura de Pagel (λ). Para atender os pressupostos do modelo, nessas análises, os dados foram sempre transformados para escala logarítmica.

Para testar a associação evolutiva entre variáveis contínuas descrevendo o fenótipo das plantas e a forma de vida, utilizamos um arcabouço de seleção de modelos evolutivos. Para cada uma das características contínuas, ajustamos sete modelos evolutivos que previam a evolução correlacionada ou não com as formas de vida em *Chamaecrista*: dois baseados no processo Browniano (BM) e cinco baseados no processo Ornstein–Uhlenbeck (OU) (Beaulieu et al. 2012). Modelos BM assumem que as características evoluem por meio de mudanças estocásticas ao longo do tempo, independente das transições entre formas de vida, sendo a intensidade desse processo dada por uma taxa evolutiva (σ^2) (Harmon 2018). Modelos OU também assumem que as características evoluem estocasticamente ao longo do tempo, mas consideram adicionalmente mudanças direcionais em direção a um valor ótimo (θ), sob uma força de atração (α), restringindo assim os valores dos traços em torno de um valor ótimo (Beaulieu et al. 2012) que poderiam ou não estar associados as transições das formas de vida em *Chamaecrista*. Os sete modelos evolutivos aplicados aos dados foram: BM1: modelo BM com um único valor de σ^2 para todas as formas de vida; BMS: modelo BM com valores distintos de σ^2 para cada forma de vida; OU1: modelo OU com um único valor de σ^2 , α e θ para todas as formas de vida; OUM: modelo OU com valores únicos de σ^2 e α para todas as formas de vida, mas com valores distintos de θ para cada forma de vida OUMA: modelo OU com valor único de σ^2 para todas as formas de vida, mas com valores distintos de α e θ para cada forma de vida; OUMV: modelo OU com valor único de α para todas as formas de vida, mas com valores distintos de σ^2 e θ para cada forma de vida; OUMVA: modelo OU com valores distintos de σ^2 , α e θ para cada forma de vida (Beaulieu et al. 2012). Antes da aplicação dos modelos, transformamos os valores das variáveis contínuas para escala logarítmica. Essa transformação é recomendada por representar mudanças fenotípicas entre espécies de forma proporcional, além de atender às suposições dos modelos evolutivos baseados em movimento browniano (O’Meara et al. 2006; Harmon 2018).

Cada modelo foi ajustado para as 110 árvores filogenéticas com reconstruções de forma de vida, utilizando a função OUwie do pacote *OUwie*. Para verificar a confiabilidade dos modelos, nós verificamos as estimativas do modelo. Descartamos modelos com estimativas biológicas irreais, isto é, como valores de θ fora do intervalo empírico dos dados, e modelos com matriz hessiana contendo autovalores negativos (Beaulieu et al. 2012). Em

seguida, avaliamos o ajuste dos modelos comparando os valores do $\Delta AICc$. Quando a diferença do $\Delta AICc$ entre o modelo com melhor ajuste e o segundo modelo com melhor ajuste foi menor que duas unidades, consideramos um empate e não escolhemos nenhum modelo como o melhor (Burnham and Anderson 2002; Alencar et al. 2017). Por fim, os parâmetros estimados sob o modelo de melhor ajuste para cada reconstrução SIMMAP foram utilizados para testar as previsões sobre a evolução das características em função das formas de vida.

Como ambas as análises exigem o uso de um único valor fenotípico por espécie, foi necessário sumarizar os dados individuais em métricas representativas para cada espécie. No entanto, utilizamos estatísticas descritivas diferentes dependendo da característica mensurada nas plantas. Como a massa de nódulos e o teor de nitrogênio foliar podem variar muito entre indivíduos e ser facilmente subestimado em função de fatores ambientais e fisiológicos limitantes, como a idade da planta, estágio fenológico e disponibilidade de recursos no solo, optamos por utilizar o valor máximo encontrado por espécie como medida mais representativa da espécie. Essa escolha pretende estimar o potencial superior de nodulação e do nitrogênio foliar de cada espécie, minimizando qualquer viés que poderia ocorrer se valores médios fossem utilizados. Esse procedimento minimiza também problemas técnicos de amostragem que conjuntamente poderiam subestimar medidas de nodulação realizadas no campo e medidas de N foliar realizadas em laboratório.

Teste da evolução correlacionada entre a forma de vida, N foliar e LMA

Para avaliar se as formas de vida representam um bom proxy para diferenciar estratégias aquisitivas e conservativas ao longo do espectro econômico das plantas, utilizamos as abordagens descritas acima. Dessa forma, primeiro aplicamos PGLS entre o LMA e o nitrogênio foliar. Essa análise teve por objetivo testar se as previsões do espectro econômico de folhas (Wright et al. 2004; Díaz et al. 2016) se alinhavam com o nosso grupo de estudo. Posteriormente aplicamos o arcabouço de seleção de modelos evolutivos para avaliar se LMA e nitrogênio foliar possuem valores ótimos distintos entre formas de vida. Os resultados dessas análises nos permitiram avaliar se a quantidade de nitrogênio foliar e LMA evoluíram de forma integrada com as formas de vida ao longo da história evolutiva do grupo.

Teste da evolução correlacionada entre os descritores da nodulação radicular e a forma de vida

Para investigar as possíveis relações alométrica e funcionais entre as características que descrevem a intensidade da interação das plantas com as bactérias fixadoras de N, e para

definir a métrica mais adequada para representar a nodulação nas análises evolutivas posteriores, nós aplicamos uma análise PGLS para testar a existência de uma correlação evolutiva entre a massa seca de nódulos e a massa seca da raiz. Essa análise teve por objetivo testar se a massa total de nódulos está condicionada ao tamanho do sistema radicular das espécies (hipótese de alometria). Como constatamos uma forte relação positiva entre essas duas variáveis, criamos uma variável controlando a alometria para representar a intensidade de nodulação das espécies de *Chamaecrista*, calculada como a razão entre a massa seca de nódulos (mg) e a massa seca de raízes (g). Essa métrica relativa permite comparações entre indivíduos e espécies de diferentes portes e foi utilizada nas análises evolutivas subsequentes. Posteriormente, para investigar se a evolução da intensidade da nodulação ocorreu de forma conjunta com as formas de vida das espécies, aplicamos o mesmo arcabouço de seleção de modelos evolutivos descrito na seção anterior. O melhor ajuste nos modelos BM ou OUI indicaria que as formas de vida e a intensidade da nodulação evoluíram independentemente na linhagem de plantas em estudo. Por outro lado, o melhor ajuste nos modelos OUM, OUMA, OUMV ou OUMVA indicaria que as formas de vida e a intensidade da interação com as bactérias fixadoras de nitrogênio estão evolutivamente correlacionados.

Resultados

Identificamos ampla variação no nitrogênio foliar e no LMA das espécies de *Chamaecrista*. Para o nitrogênio foliar, encontramos uma variação de 8.1 mg/g em *C. confertifomis* a 45.6 mg/g de folha em *C. mimosoides* (média 20.7 ± 9.1 mg/g). A variação do LMA também foi ampla entre as espécies, variando de 20.02 g/m² (*C. pilosa*) a 346.43 g/m² (*C. confertifomis*), média da linhagem em 108.51 ± 56.40 g/m². Descobrimos que a evolução de um maior investimento em massa por área foliar (g/m²) esteve associada a um menor conteúdo de nitrogênio foliar (mg/g) ($\beta = -0.59$, $p < 0.001$, $\lambda = 0.06$) (Figura 2A). Além disso, o modelo OUM, que estima valores ótimos (θ) distintos para cada forma de vida obteve o melhor ajuste para essas duas características (Tabela 1), indicando que cada forma de vida possui ótimos fenotípicos distintos. Para o teor de nitrogênio foliar, houve um empate entre os modelos OUM e OUMV, com cada um sendo selecionado como o melhor modelo em 23 das 110 árvores analisadas, além disso, em 60 árvores, os dois modelos obtiveram ajuste semelhante ($\Delta AICc < 2$), sem uma distinção clara de desempenho. Como ambos os modelos assumem múltiplos ótimos adaptativos (θ), diferindo apenas na estimativa das taxas evolutivas e os valores de θ foram similares entre eles (Material Suplementar S1), pelo critério de simplicidade, selecionamos o modelo OUM como o que obteve o melhor ajuste. Assim, os ótimos fenotípicos para o conteúdo de nitrogênio foliar foram maiores para as

linhagens anuais, intermediários para a linhagem das perenes não rebrotantes e baixos para as perenes rebrotantes (Tabela 1, Figura 2b). Além disso, os ótimos fenotípicos de LMA foram mais baixos nas espécies anuais, intermediários nas perenes não rebrotantes e mais elevados nas perenes rebrotantes (Tabela 1, Figura 2c). Estes resultados indicam que a evolução das formas de vida ocorre em conjunto com outras características funcionais que estão associadas ao espectro econômico das plantas.

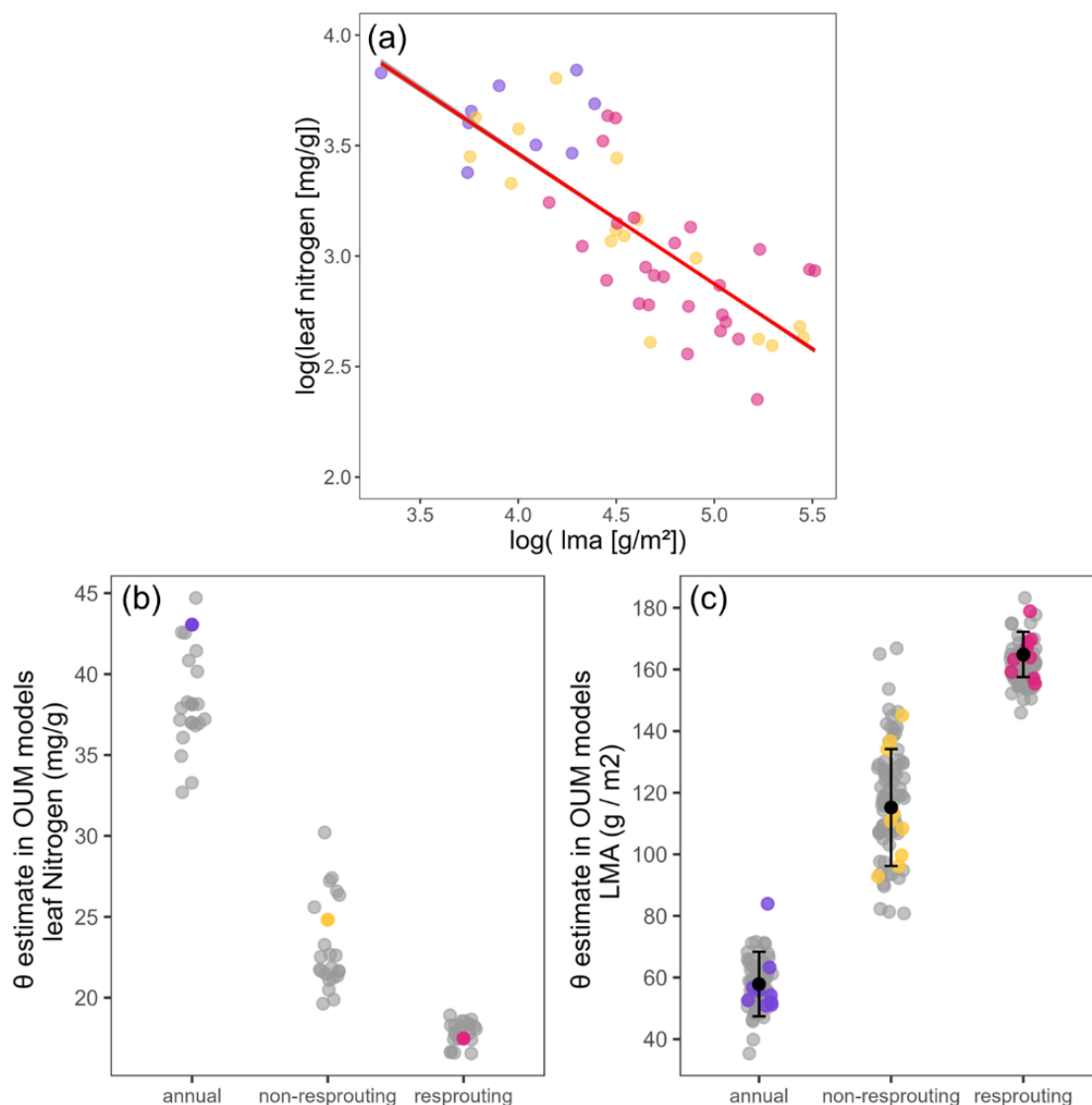


Figura 2: Relações evolutivas entre forma de vida e características foliares. (A) Evolução correlacionada prevista pelo modelo PGLS entre o lma e o nitrogênio foliar. (B) Ótimos fenotípicos (θ) estimados pelo modelo OUM (modelo com melhor ajuste) para o conteúdo de nitrogênio foliar; (C) Ótimos fenotípicos (θ) estimados pelo modelo OUM (modelo com melhor ajuste) para o LMA. No gráfico A cada ponto representa o fenótipo máximo mensurado em material herborizado para cada espécie de *Chamaecrista* e a linha vermelha representa a relação evolutiva estimada pelo modelo PGLS ($p < 0.05$). Nos gráficos B e C cada ponto corresponde ao valor de θ estimado por cada modelo considerado o melhor, excluindo empates. As barras de erro correspondem ao desvio padrão entre as estimativas da árvore de consenso e os pontos cinzas são os valores estimados para as 100 árvores filogenéticas alternativas. Em todos os gráficos a cor representa uma forma de vida. Roxas: anuais, amarelo: perenes não rebrotantes e rosa: perenes rebrotantes.

Tabela 1: Modelos evolutivos com melhor ajuste para cada característica investigada e seus respectivos parâmetros estimados: ótimo adaptativo (θ), taxa evolutiva (σ^2) e força de atração ao ótimo (α). Os valores são apresentados para cada forma de vida (anuais, perenes não rebrotantes e perenes rebrotantes) de acordo o modelo que melhor se ajusta aos dados, em geral o modelo OUM. A coluna % de árvores filogenéticas que suportam o modelo de melhor ajuste indica a porcentagem de árvores filogenéticas nas quais o modelo listado foi selecionado como o melhor ($\Delta AICc = 0$, desconsiderando empates). As características analisadas incluem intensidade de nodulação (mg de nódulos por g de raiz seca), teor de nitrogênio foliar (mg/g) e massa foliar por área – LMA (g/m^2).

característica	Modelo com melhor ajuste	% de árvores filogenéticas que suportam o modelo de melhor ajuste	Parâmetros evolutivos estimados			
			Forma de vida	θ	σ^2	α
Conteúdo de nitrogênio foliar (mg/g)	OUM*	20.9	anuais	38.3	0.6	2.7
			perenes não rebrotantes	23.1	0.6	2.7
			perenes rebrotantes	17.8	0.6	2.7
lma (g/m^2)	OUM	75.4	anuais	57.6	0.2	0.6
			perenes não rebrotantes	118.4	0.2	0.6
			perenes rebrotantes	160.6	0.2	0.6
Intensidade da nodulação (mg/g)	OUM	90	anuais	47.9	16.7	5.5
			perenes não rebrotantes	46.9	16.7	5.5
			perenes rebrotantes	5.0	16.7	5.5

* Para o teor de nitrogênio foliar, houve empate entre os modelos OUM e OUMV. Ambos possuem o mesmo número de árvores com melhor ajuste, e os valores estimados de θ foram semelhantes. Por simplicidade e consistência, optamos por apresentar os parâmetros estimados apenas pelo modelo OUM.

A intensidade da nodulação, avaliada como a massa de nódulos por unidade de massa de raiz variou de 1.6 mg/g em *C. rossicorum* a 222.1 mg/g de raiz em *C. desvauxii* (média 27.16 ± 48.64 mg/g). As espécies também possuem uma grande variação morfológica na estrutura dos nódulos radiculares (Figura 1d-i). O ajuste do modelo PGLS, indicou a evolução correlacionada da massa da raiz (g) com a massa de nódulos radiculares (mg), no qual a evolução de raízes maiores esteve associada a um aumento da intensidade de interação com as bactérias fixadoras de nitrogênio ($\beta = 0.59$, $p = 0.01$, $\lambda = 0.47$) (Figura 3A).

O ajuste dos diferentes modelos evolutivos indicou que cada forma de vida possui ótimos fenotípicos distintos para a intensidade da nodulação. Assim como nas análises anteriores o modelo OUM obteve melhor ajuste aos dados. Para a intensidade da nodulação, os ótimos fenotípicos estimados para as linhagens anuais e perenes não rebrotantes foram maiores e tiveram valores similares. Por outro lado, os valores de θ estimados para as linhagens perenes rebrotantes foram muito menores, indicando uma redução na intensidade da nodulação durante a evolução dessas plantas (Tabela 1, Figura 3B). Em média, os ótimos fenotípicos para a intensidade da nodulação das linhagens anuais e perenes não rebrotantes foram 9.3 vezes maiores do que os ótimos das linhagens perenes rebrotantes.

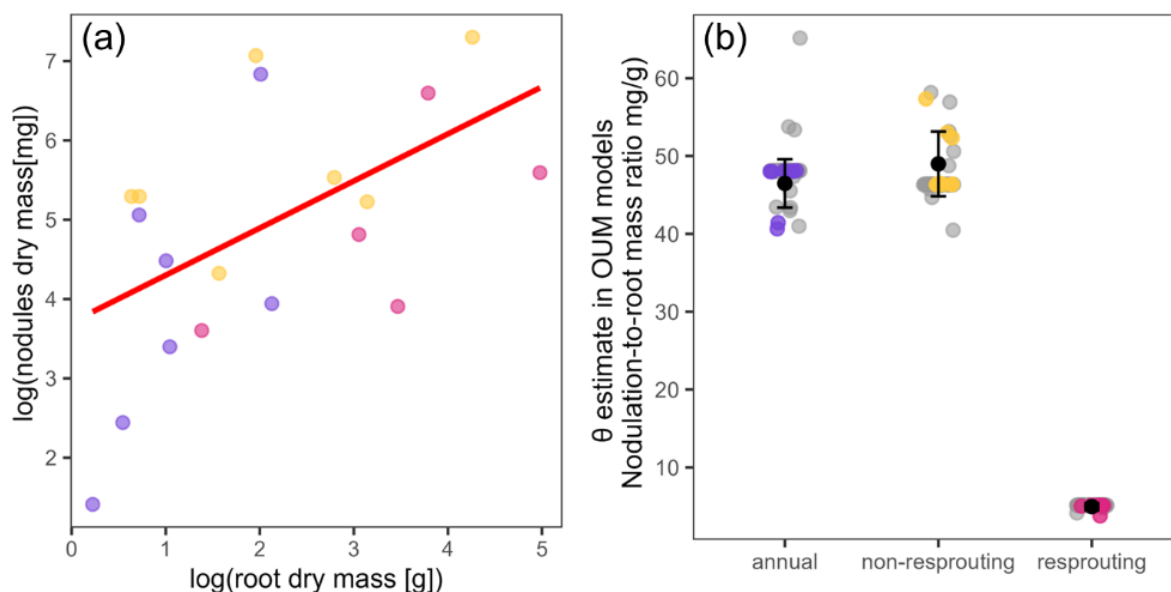


Figura 3: Relações evolutivas entre estratégias funcionais das plantas e nodulação. (A) Evolução correlacionada prevista pelo modelo PGLS entre massa da raiz e nodulação. (B) Ótimos fenotípicos (θ) estimados pelo modelo OUM (modelo com melhor ajuste) para a intensidade da nodulação. No gráfico A cada ponto representa a intensidade máxima de nodulação encontrada em cada espécie amostrada no campo e a linha vermelha representa a relação evolutiva estimada pelo modelo PGLS ($p < 0.05$). No gráfico B e cada ponto corresponde ao valor de θ estimado por cada modelo considerado o melhor, excluindo empates. As barras de erro correspondem ao desvio padrão entre as estimativas da árvore de consenso e os pontos cinzas são os valores estimados para as 100 árvores filogenéticas alternativas. Em todos os gráficos a cor representa uma forma de vida. Roxas: anuais, amarelo: perenes não rebrotantes e rosa: perenes rebrotantes.

Discussão

Investigamos como a intensidade do mutualismo de fixação de nitrogênio, via nodulação radicular, evoluiu em um clado de *Chamaecrista* de ecossistemas sazonais sul-americanos. Essa linhagem passou por transições de florestas para áreas mais abertas e secas, acompanhadas pela especialização celular dos nódulos, incluindo o surgimento de simbiossomas (Sprent et al. 2017; Casaes et al. 2024). No entanto, as variações evolutivas na

intensidade dessa interação e seus determinantes permaneciam desconhecidas. Considerando a divergência metabólica e ecológica entre as formas de vida (Prochazka et al. 2024), testamos o pressuposto de que as formas de vida evoluem junto com as características funcionais associadas à aquisição e uso de recursos. Descobrimos que linhagens anuais evoluíram menor LMA e maior teor de nitrogênio foliar, enquanto perenes, especialmente as rebrotantes, evoluíram o padrão oposto. Além disso, detectamos evolução correlacionada entre LMA e teor de nitrogênio foliar, com maior LMA associado a menor teor de nitrogênio. Esses resultados estão de acordo com os padrões globais do espectro econômico de folhas. (Wright et al. 2004; Díaz et al. 2016) e confirmam nosso pressuposto de que as forma de vida em *Chamaecrista* são um bom proxy para diferenciar as estratégias no uso e aquisição de recursos.

Nossas hipóteses previam que a intensidade simbiótica com bactérias fixadoras de nitrogênio divergiu entre as diferentes formas de vida devido a mudanças evolutivas no metabolismo vegetal e na estratégia de aquisição e uso de recursos. Especificamente, previmos que a evolução na intensidade da interação acompanhou a evolução das diferentes formas de vida, de modo que: (i) linhagens anuais com altas taxas fotossintéticas e reprodução rápida evoluíram intensidades altas de interação, ii) linhagens perenes de crescimento rápido sem rebrota radicular; evoluíram intensidades moderadas e (iii) perenes altamente conservativas com sistema de rebrota evoluíram interações menos intensa. Nossos resultados corroboram parcialmente as hipóteses: como previsto, linhagens de plantas anuais evoluíram maior nodulação, e linhagens de perenes rebrotantes, menor. No entanto, linhagens perenes não-rebrotantes evoluíram nodulação elevada, divergindo da expectativa de padrão intermediário. Esses achados destacam a relevância do contexto evolutivo e características funcionais para entender investimentos em simbioses nutricionais em ambientes tropicais sazonais.

O fato de todas as formas de vida investigadas interagirem com as bactérias fixadoras de nitrogênio indica que essa simbiose desempenha um papel funcional relevante para essa linhagem de leguminosas. Especificamente essa linhagem de *Chamaecrista* ocupa nichos sazonais com baixa disponibilidade de nitrogênio, como áreas abertas de cerrado e afloramentos rochosos em campos rupestres (Prochazka et al. 2024). Tais ambientes possuem limitação severa de nutrientes por pelo menos um período do ano, sobretudo quando comparados às florestas adjacentes, onde os estoques de nitrogênio no solo são geralmente mais elevados e estáveis (Franco 2002; Benites et al. 2007; Hengl et al. 2017). Nessas condições, a nodulação pode representar uma via mais confiável e estável de aquisição de nitrogênio, especialmente quando as fontes edáficas são escassas ou altamente variáveis

(Gutschick 1981; Vitousek et al. 2002; Kobayashi et al. 2021). A capacidade de estabelecer essa simbiose pode ter favorecido a colonização de habitats nutricionalmente limitantes, viabilizando o acesso a recursos essenciais em locais que, de outra forma, seriam restritivos (Sprent et al. 2017; Casaes et al. 2024). Esse processo pode ter contribuído para a diversificação e expansão das espécies de *Chamaecrista* em ecossistemas abertos e sazonalmente secos da América do Sul. Embora essa interação seja generalizada entre as espécies analisadas, nossos resultados indicam que a intensidade da nodulação entre as espécies e os ótimos fenotípicos para as diferentes formas de vida são distintos.

A evolução da nodulação no nosso grupo de estudo parece obedecer a dois padrões complementares: (i) plantas com raízes maiores tendem a evoluir maior massa total de nódulos, e (ii) estratégias ecológicas mais aquisitivas e com maiores taxas fotossintéticas evoluíram maior investimento relativo em nódulos por unidade de massa radicular. Nossos resultados indicam que a interação com bactérias fixadoras de nitrogênio segue uma relação alométrica negativa ($\beta < 1$), na qual o aumento da massa radicular está associado a incrementos menores de massa de nódulos. Esse tipo de relação sugere que a evolução do aumento no crescimento da raiz restringe a evolução da nodulação, possivelmente devido a custos fisiológicos ou restrições ecológicas associadas com alto investimento em crescimento abaixo do solo. Assim, raízes maiores, geralmente associadas a estratégias mais conservativas, alocam proporcionalmente menos recursos para interação com bactérias fixadoras de nitrogênio. Além disso, ao considerar as diferentes formas de vida e controlar os efeitos da alometria, descobrimos que a estratégia ecológica das linhagens representada pelas diferentes formas de vida é um fator importante para a evolução da intensidade da nodulação, pois, estratégias ecológicas aquisitivas como as anuais, evoluíram alta densidade de nódulos por unidade de massa radicular. Esses resultados sugerem que a evolução da simbiose é modulada prioritariamente pela taxa metabólica e pela estratégia de uso e aquisição de recursos.

As previsões dos modelos de alocação de recursos que incorporam interações mutualistas radiculares indicam que plantas ruderais tendem a não investir em mutualismos abaixo do solo, priorizando o uso dos recursos adquiridos para reprodução, seguidos de crescimento e defesa (Deyn 2017). No entanto, o ótimo fenotípico de intensidade de nodulação detectado para as linhagens anuais em nosso estudo é oposto a essa expectativa. Embora a intensidade da nodulação não quantifique diretamente a alocação de carbono para a simbiose, nossos resultados indicam que essa interação foi mantida e possivelmente favorecida ao longo da evolução dessas linhagens. Nossos resultados indicam que a fixação biológica de nitrogênio representa uma via eficiente para sustentar as altas taxas metabólicas dessas plantas, que demandam grande quantidade de nutrientes para promover crescimento

rápido e reprodução. Esse padrão já foi registrado, por exemplo, em *Chamaecrista nictitans*, espécie anual altamente dependente da associação com rizóbios para completar seu ciclo de vida (Souza et al. 2025). Nessa espécie, a exclusão das bactérias fixadoras compromete o crescimento e a reprodução, inviabilizando a nutrição adequada poucos dias após a germinação (Souza et al. 2025). O elevado teor de nitrogênio foliar e o baixo LMA observados nas linhagens anuais corroboram a ideia de que essas plantas possuem alta capacidade fotossintética e, consequentemente, maior assimilação de carbono, um fator que pode reduzir o custo relativo da simbiose e tornar o mutualismo mais vantajoso (Kobayashi et al. 2021). Assim, a manutenção e provável intensificação da nodulação nas anuais podem ter sido favorecidas por um ciclo de retroalimentação positiva entre fixação de nitrogênio, fotossíntese e assimilação de carbono. Nesse ciclo, o aumento na disponibilidade de nitrogênio sustenta taxas mais elevadas de fotossíntese e produção de biomassa, gerando mais carbono que, por sua vez, pode ser realocado para a simbiose. Esse mecanismo pode favorecer a produção rápida e abundante de sementes, que são os principais sumidouros de nitrogênio devido à elevada demanda desse nutriente para formação das sementes (Sinclair and Wit 1975; Schiltz et al. 2005). Dessa forma, o feedback positivo entre disponibilidade de nitrogênio, fotossíntese e reprodução pode ter ampliado os ganhos líquidos da interação e aumentado a aptidão reprodutiva das plantas, favorecendo sua manutenção e intensificação ao longo do tempo evolutivo como uma estratégia eficiente para maximizar o desempenho das linhagens anuais.

Nas linhagens perenes não rebrotantes, encontramos um padrão funcional e evolutivo mais complexo, caracterizado por ótimos fenotípicos com alta intensidade de nodulação associados a baixos teores de nitrogênio foliar. Diferente das anuais, o padrão encontrado sugere que a manutenção e evolução de uma simbiose mais intensa pode ocorrer mesmo que o desempenho e as taxas fotossintéticas das espécies seja moderado. Esse resultado também contrasta as previsões do modelo proposto por Deyn (2017) que prevê alocação intermediária de recursos para nodulação em plantas competidoras. Duas explicações não excludentes podem justificar esse padrão evolutivo. Primeiro, essas linhagens podem ter evoluído mecanismos de regulação simbiótica capazes de modular o investimento em nodulação ao longo do ciclo de vida (Ferguson and Mathesius 2014), intensificando o aporte de recursos às bactérias em fases fenológicas críticas, como floração e frutificação, e reduzindo-o em períodos de baixa demanda ou alto custo energético (Gurusamy et al. 2000). Essa regulação é compatível com modelos teóricos de otimização da nodulação (Kobayashi et al. 2021) e com evidências experimentais de controle ativo do funcionamento dos nódulos pela planta hospedeira (Kiers et al. 2003; Kiers and Denison 2008). Alternativamente, os baixos teores de

nitrogênio foliar podem refletir a alocação preferencial desse nutriente para outros órgãos da planta como reservas caulinares ou estruturas reprodutivas (Chapin III et al. 1990; Vergutz et al. 2012). Seja pela regulação dinâmica da associação simbiótica ou pelo redirecionamento estratégico do nitrogênio dentro da planta, nossos resultados indicam que o alto investimento em nodulação foi favorecido nas linhagens perenes não rebrotantes. Esse investimento pode garantir um balanço positivo de nutrientes ao proporcionar um suprimento contínuo e previsível de nitrogênio ao longo de vários anos, condição essencial para sustentar o metabolismo, manter estruturas vegetativas e acumular reservas (Chapin III et al. 1990; Wright et al. 2004). Dessa forma, a elevada nodulação nessas linhagens pode representar uma estratégia evolutiva estável, em que o benefício da simbiose está diretamente associado à manutenção funcional de longo prazo.

De acordo com o modelo de alocação de recursos (Deyn 2017), espera-se que espécies conservativas invistam fortemente em mutualismos radiculares. No entanto, nossos resultados não corroboram essa previsão: as espécies perenes rebrotantes possuem ótimos fenotípicos muito menores de intensidade de nodulação, sugerindo um ajuste evolutivo do mutualismo nutricional à transição para uma estratégia conservativa. Essas linhagens são caracterizadas por crescimento lento, folhas com alto LMA e estruturas subterrâneas de reserva que favorecem o rebrote após distúrbios (Prochazka et al. 2024). A redução na intensidade da nodulação nessas plantas pode ter sido favorecida por pressões seletivas associadas tanto a limitações fisiológicas quanto a demandas nutricionais mais baixas. Os baixos teores de nitrogênio foliar indicam capacidade fotossintética limitada, o que reduz a assimilação de carbono disponível para sustentar a simbiose. Como a manutenção dos nódulos e a fixação de nitrogênio atmosférico impõem custos metabólicos substanciais, essa limitação pode gerar um *trade-off* que torna o mutualismo mais oneroso em condições de baixa taxa fotossintética (Kobayashi et al. 2021). Além disso, espécies de metabolismo mais lento, típicas de estratégias conservativas, têm menor demanda de nutrientes por unidade de tempo, incluindo nitrogênio (Chapin III et al. 1990; Wright et al. 2004), de modo que os benefícios nutricionais da simbiose podem ser alcançados mesmo com menor intensidade de nodulação. Assim, a evolução de uma nodulação menos intensa em perenes rebrotantes pode refletir *trade-offs* evolutivos característicos de estratégias conservativas, nos quais um metabolismo mais baixo impõe limites ao investimento simultâneo em simbiontes e em estruturas subterrâneas de reserva que conferem resiliência frente a distúrbios. Nessa perspectiva, a manutenção da simbiose em intensidade moderada pode refletir uma estratégia evolutiva estável, compatível com um uso mais conservativo e eficiente dos recursos.

Em conjunto, nossos resultados indicam que a nodulação é uma característica funcional amplamente mantida na linhagem *Chamaecrista*, cuja evolução não foi moldada por uma resposta única à limitação de nitrogênio, mas sim, por múltiplas pressões seletivas que equilibraram o investimento energético para aquisição mais eficiente de nutrientes. A divergência nos ótimos fenotípicos de nodulação entre as formas de vida indica que a intensidade da simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio respondeu a diferentes demandas fisiológicas, ciclos de vida e restrições ambientais. Essa diversidade de respostas fenotípicas ao longo do tempo evolutivo é compatível com os modelos teóricos de custo-benefício dos mutualismos, que preveem a persistência da simbiose quando os benefícios superam os custos de sua manutenção (Kiers and Denison 2008; Kiers et al. 2010; Leigh 2010; Kobayashi et al. 2021). Nessa perspectiva, a nodulação em *Chamaecrista* emerge como uma característica lábil, que evolui em função de demandas ecológicas e funcionais de cada linhagem dentro do grupo. Embora nossos dados não permitam avaliar diretamente a dependência ou a especificidade da simbiose com as bactérias fixadoras de nitrogênio, os padrões observados sugerem a existência de cenários evolutivos distintos de dependência da simbiose, que podem ir de interações mais obrigatórias (e.g., Souza et al. 2024, 2025) para interações mais facultativas (e.g., Pain et al. 2018) os quais merecem ser explorados em estudos futuros. Nossos resultados reforçam uma visão integrada e funcional da evolução dos mutualismos, destacando que sua persistência ao longo do tempo depende não apenas da presença de parceiros simbióticos ou da disponibilidade de recursos, mas da compatibilidade entre os benefícios líquidos da interação e o metabolismo das linhagens.

Referências

- Alencar, L. R. V., M. Martins, G. Burin, and T. B. Quental. 2017. Arboreality constrains morphological evolution but not species diversification in vipers. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences* 284:1–7. Royal Society Publishing.
- Beaulieu, J. M., D. C. Jhwueng, C. Boettiger, and B. C. O'Meara. 2012. Modeling stabilizing selection: Expanding the Ornstein-Uhlenbeck model of adaptive evolution. *Evolution (N Y)* 66:2369–2383.
- Bellingham, P. J., and A. D. Sparrow. 2000. Resprouting as a life history strategy in woody plant communities. *Oikos* 89:409–416.
- Benites, V. M., C. E. G. R. Schaefer, F. N. B. Simas, and H. G. Santos. 2007. Soils associated with rock outcrops in the Brazilian mountain ranges Mantiqueira and Espinhaço. *Revista Brasileira de Botânica* 569–577.
- Bergmann, J., A. Weigelt, F. Van Der Plas, D. C. Laughlin, T. W. Kuyper, N. Guerrero-Ramirez, O. J. Valverde-Barrantes, H. Bruehlheide, G. T. Freschet, C. M. Iversen, J. Kattge, M. L. McCormack, I. C. Meier, M. C. Rillig, C. Roumet, M. Semchenko, C. J. Sweeney, J. Van Ruijven, L. M. York, and L. Mommer. 2020. The fungal collaboration gradient dominates the root economics space in plants.

- Boyko, J. D., and J. M. Beaulieu. 2021. Generalized hidden Markov models for phylogenetic comparative datasets. *Methods Ecol Evol* 12:468–478.
- Bronstein, J. L. 1994. Conditional outcomes in mutualistic interactions. *Trends Ecol Evol* 9:214–217.
- Bronstein, J. L. 2001. The Costs of Mutualism. *Am Zool* 41:825–839.
- Bruneau, A. et al. 2008. Phylogenetic patterns and diversification in the caesalpinoid legumes. *Botany*. 86(7): 697-718.
- Burnham, K., and D. R. Anderson. 2002. Model selection and multimodel inference a practical information theoretic approach.
- Casaes, P. A., J. M. Ferreira Dos Santos, V. C. Silva, M. F. K. Rhem, M. M. Teixeira Cota, S. M. De Faria, J. G. Rando, E. K. James, and E. Gross. 2024. The radiation of nodulated *Chamaecrista* species from the rainforest into more diverse habitats has been accompanied by a reduction in growth form and a shift from fixation threads to symbiosomes. *J Exp Bot* 75:3643–3662. Oxford University Press.
- Chapin III, F. S., E.-D. Schulze, and H. A. Mooney. 1990. The ecology and economics of storage in plants. *Annu. Rev. Ecol Syst* 21:423–470.
- Conceição, A. de S., L. P. de Queiroz, G. P. Lewis, M. J. G. de Andrade, P. R. M. de Almeida, A. S. Schnadelbach, and C. van den Berg. 2009. Phylogeny of *Chamaecrista* Moench (Leguminosae-Caesalpinioideae) based on nuclear and chloroplast DNA regions. *Taxon* 58:1168–1180. International Association for Plant Taxonomy.
- Cota, M. M. T., J. G. Rando, D. Cardoso, A. de S. Conceição, C. Snak, and L. P. de Queiroz. 2025. Circumscribing *Chamaecrista* section *Baseophyllum* (Caesalpinioideae, Leguminosae) based on molecular data and morphology. *Botanical Journal of the Linnean Society*, doi: 10.1093/botlinnean/boaf007.
- Craine, J. M., B. M. J. Engelbrecht, C. H. Lusk, N. G. McDowell, and H. Poorter. 2012. Resource limitation, tolerance, and the future of ecological plant classification. *Frontiers Research Foundation*.
- Deyn, G. B. D. 2017. Plant life history and above–belowground interactions: missing links. *Oikos* 126:497–507. Blackwell Publishing Ltd.
- Díaz, S., J. Kattge, J. H. C. Cornelissen, I. J. Wright, S. Lavorel, S. Dray, B. Reu, M. Kleyer, C. Wirth, I. Colin Prentice, E. Garnier, G. Bönsch, M. Westoby, H. Poorter, P. B. Reich, A. T. Moles, J. Dickie, A. N. Gillison, A. E. Zanne, J. Chave, S. Joseph Wright, S. N. Sheremet Ev, H. Jactel, C. Baraloto, B. Cerabolini, S. Pierce, B. Shipley, D. Kirkup, F. Casanoves, J. S. Joswig, A. Günther, V. Falczuk, N. Rüger, M. D. Mahecha, and L. D. Gorné. 2016. The global spectrum of plant form and function. *Nature* 529:167–171. Nature Publishing Group.
- Evans, J. R. 1989. Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of Ca plants. *Oecologia* 78:9–19.
- Evans, J. R., and V. C. Clarke. 2019. The nitrogen cost of photosynthesis. Oxford University Press.
- Ferguson, B. J., and U. Mathesius. 2014. Phytohormone Regulation of Legume-Rhizobia Interactions. *J Chem Ecol* 40:770–790.
- Franco, A. C. 2002. Ecophysiology of Woody Plants. Pp. 178–197 in P. S. Oliveira and R. L. Marquis, eds. *The Cerrados of Brazil Ecology and Natural History of a Neotropical Savanna*. Columbia University Press, New York.

- Friesen, M. L., S. S. Porter, S. C. Stark, E. J. Von Wettberg, J. L. Sachs, and E. Martinez-Romero. 2011. Microbially mediated plant functional traits. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 42.
- Grime, J. P. 1977. Evidence for the Existence of Three Primary Strategies in Plants and Its Relevance to Ecological and Evolutionary Theory. *Am Nat* 111:1169–1194.
- Gurusamy, C., P. J. Davis, and A. K. Bal. 2000. Seasonal changes in perennial nodules of beach pea (*Lathyrus maritimus* [L.] Bigel.) With special reference to oleosomes.
- Gutschick, V. P. 1981. Evolved Strategies in Nitrogen Acquisition. *Am Nat* 118:607–637.
- Harmon, L. J. 2018. Phylogenetic Comparative Methods Learning from trees.
- Hengl, T., J. M. De Jesus, G. B. M. Heuvelink, M. R. Gonzalez, M. Kilibarda, A. Blagotić, W. Shangguan, M. N. Wright, X. Geng, B. Bauer-Marschallinger, M. A. Guevara, R. Vargas, R. A. MacMillan, N. H. Batjes, J. G. B. Leenaars, E. Ribeiro, I. Wheeler, S. Mantel, and B. Kempen. 2017. SoilGrids250m: Global gridded soil information based on machine learning. *PLoS One* 12. Public Library of Science.
- Harms, D. A., and W. J. Mattson. 1992. The dilemma of plants: to grow or defend. *Q Rev Biol* 67:283–335.
- Herendeen P.S., Bruneau, a., Lewis, G.P. 2003. Phylogenetic relationships in Caesalpinioideae legumes: a preliminary analysis based on morphological and molecular data. Pages 37–62 in BB Klitgaard, A Bruneau, eds. *Advances in legume systematics*. Pt 10. Royal Botanic Gardens, Kew
- Herridge, D. F. 2008. Inoculation Technology for legume. Pp. 77–109 in *Nitrogen-fixing Leguminous Symbioses*.
- Holland, J. N., D. L. DeAngelis, and J. L. Bronstein. 2002. Population dynamics and mutualism: Functional responses of benefits and costs. *American Naturalist* 159:231–244.
- Kiers, E. T., and R. F. Denison. 2008. Sanctions, cooperation, and the stability of plant-rhizosphere mutualisms.
- Kiers, E. T., T. M. Palmer, A. R. Ives, J. F. Bruno, and J. L. Bronstein. 2010. Mutualisms in a changing world: An evolutionary perspective. *Ecol Lett* 13:1459–1474.
- Kiers, E. T., R. A. Rousseau, S. A. West, and R. F. Denison. 2003. Host sanctions and the legume-rhizobium mutualism. *Nature* 425:78–81.
- Kobayashi, R., S. Yamaguchi, and Y. Iwasa. 2021. Optimal control of root nodulation – Prediction of life history theory of a mutualistic system. *J Theor Biol* 510. Academic Press.
- Leigh, E. G. 2010. The evolution of mutualism.
- LPWG, 2017. A new subfamily classification of the leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. *Taxon* 66:44–77. John Wiley and Sons Inc.
- Naisbitt, T., E. K. James, and J. I. Sprent. 1992. The evolutionary significance of the legume genus *Chamaecrista*, as determined by nodule structure. *New Phytologist* 122:487–492.
- Noë, R., Peter Hammerstein, and P Hammerstein. 1994. Biological markets: supply and demand determine the effect of partner choice in cooperation, mutualism and mating.
- Oldroyd, G. E. D., and R. Dixon. 2014. Biotechnological solutions to the nitrogen problem.
- O'Meara, B. C., C. C. Ané, M. J. Sanderson, and P. C. Wainwright. 2006. Testing for different rates of continuous trait evolution using likelihood. *Evolution (N Y)* 60:922–933.

- Pain, R. E., R. G. Shaw, and S. N. Sheth. 2018. Detrimental effects of rhizobial inoculum early in the life of partridge pea, *Chamaecrista fasciculata*. *Am J Bot* 105:796–802.
- Pausas, J. G., B. B. Lamont, S. Paula, B. Appezzato-da-Glória, and A. Fidelis. 2018. Unearthing belowground bud banks in fire-prone ecosystems. *New Phytologist* 217:1435–1448. Blackwell Publishing Ltd.
- Peoples, M. B., A. W. Faizah, B. Rerkasem, and D. F. Herridge. 1989. Methods for evaluating nitrogen fixation by nodulated legumes in the field. (Australian Centre for International Agricultural Research 76. Australian Centre for International Agricultural Research.
- Poorter, H., Ü. Niinemets, L. Poorter, I. J. Wright, and R. Villar. 2009. Causes and consequences of variation in leaf mass per area (LMA): A meta-analysis. *New Phytologist* 182:565–588.
- Pringle, E. G. 2016. Integrating plant carbon dynamics with mutualism ecology. *New Phytologist* 210:71–75. Blackwell Publishing Ltd.
- Prochazka, L. S., S. Alcantara, J. G. Rando, T. Vasconcelos, R. C. Pizzardo, and A. Nogueira. 2024. Resource availability and disturbance frequency shape evolution of plant life forms in Neotropical habitats. *New Phytologist* 242:760–773. John Wiley and Sons Inc.
- Rando, J. G., M. M. T. Cota, A. G. Lima, R. L. C. Bortoluzzi, B. Marazzi, and A. S. Conceição. 2024. Tribe Cassieae. Pp. 83–102 in A. Bruneau, L. P. Queiroz, and Ringelberg J. J., eds. *Advances in Legume Systematics 14. Classification of Caesalpinioideae. Part 2: Higher-level classification*. PhytoKeys.
- Rando, J. G., A. R. Zuntini, A. S. Conceição, C. van den Berg, J. R. Pirani, and L. P. de Queiroz. 2016. Phylogeny of *Chamaecrista* ser. *Coriaceae* (Leguminosae) unveils a lineage recently diversified in Brazilian campo Rupestre vegetation. *Int J Plant Sci* 177:3–17. University of Chicago Press.
- Reich, P. B. 2014. The world-wide “fast-slow” plant economics spectrum: A traits manifesto. *Journal of Ecology* 102:275–301.
- Revell, L. J. 2012. phytools: An R package for phylogenetic comparative biology (and other things). *Methods Ecol Evol* 3:217–223.
- Sachs, J. L., and E. L. Simms. 2006. Pathways to mutualism breakdown.
- Schiltz, S., N. Munier-Jolain, C. Jeudy, J. Burstin, and C. Salon. 2005. Dynamics of exogenous nitrogen partitioning and nitrogen remobilization from vegetative organs in pea revealed by ¹⁵N in vivo labeling throughout seed filling. Pp. 1463–1473 in *Plant Physiology*. American Society of Plant Biologists.
- Sinclair, T. R., and C. Wit. 1975. Photosynthate and Nitrogen Requirements for Seed Production by Various Crops. *Science*, *Science* (1979) 565–567.
- Souza, A. de S., G. P. Lewis, and M. J. da Silva. 2021. A new infrageneric classification of the pantropical genus *Chamaecrista* (Fabaceae: Caesalpinioideae) based on a comprehensive molecular phylogenetic analysis and morphology. *Botanical Journal of the Linnean Society* XX:1–46.
- Souza, C., L. C. Leal, V. Lima, B. Melati, D. Centeno, E. Gross, A. L. Urzedo, and A. Nogueira. 2025. High dependence on nitrogen-fixing bacteria in a Neotropical legume species. *Symbiosis* 95:215–224. Springer Science and Business Media B.V.
- Souza, C., L. B. Valadão-Mendes, I. Schulze-Albuquerque, P. J. Bergamo, D. D. Souza, and A. Nogueira. 2024. Nitrogen-fixing bacteria boost floral attractiveness in a tropical legume species during nutrient limitation. *Am J Bot* 111.

Sprent, J. I., J. Ardley, and E. K. James. 2017. *Biogeography of nodulated legumes and their nitrogen-fixing symbionts*. Blackwell Publishing Ltd.

Vance, C. P. 2001. Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. Plant nutrition in a world of declining renewable resources. *American Society of Plant Biologists*.

Vergutz, L., S. Manzoni, A. Porporato, R. F. Novais, and R. B. Jackson. 2012. Global resorption efficiencies and concentrations of carbon and nutrients in leaves of terrestrial plants. *Ecol Monogr* 82:205–220.

Vitousek, P. M., K. Cassman, C. Cleveland, T. Crews, C. B. Field, N. B. Grimm, R. W. Howarth, R. Marino, L. Martinelli, E. B. Rastetter, and J. I. Sprent. 2002. Towards an ecological understanding of biological nitrogen fixation.

Warembourg, F. R., D. Montange, and R. Bardin. 1982. The simultaneous use of $^{14}\text{CO}_2$ and $^{15}\text{N}_2$ labelling techniques to study the carbon and nitrogen economy of legumes grown under natural conditions. *Physiol Plant* 56:46–55.

Wright, I. J., P. B. Reich, M. Westoby, D. D. Ackerly, Z. Baruch, F. Bongers, J. Cavender-Bares, T. Chapin, J. H. C. Cornelissen, M. Diemer, J. Flexas, E. Garnier, P. K. Groom, J. Gulias, K. Hikosaka, B. B. Lamont, T. Lee, W. Lee, C. Lusk, J. J. Midgley, M.-L. Navas, U. " Lo Niinemets, J. Oleksyn, N. Osada, H. Poorter, P. Poot, L. Prior, V. I. Pyankov, C. Roumet, S. C. Thomas, M. G. Tjoelker, E. J. Veneklaas, and R. Villar. 2004. The worldwide leaf economics spectrum.

Zheng, M., M. Xu, D. Li, Q. Deng, and J. Mo. 2023. Negative responses of terrestrial nitrogen fixation to nitrogen addition weaken across increased soil organic carbon levels. *Science of the Total Environment* 877. Elsevier B.V.

Material Suplementar

Material Suplementar S1: Ajustes dos modelos evolutivos para o conteúdo de nitrogênio foliar. Ouve um empate entre os modelos OUM e OUMV.

Tabela S1: Ajuste dos modelos evolutivos para o conteúdo de nitrogênio foliar para cada árvore filogenética analisada.

	BM1	BMS	OU1	OUM	OUMA	OUMV	OUMVA
fittings	110	110	110	106	35	100	46
best	0	0	2	23	0	23	1
tie	0	0	2	61	1	60	1
frequency (%)	0	0	1.82	20.91	0.00	20.91	0.91

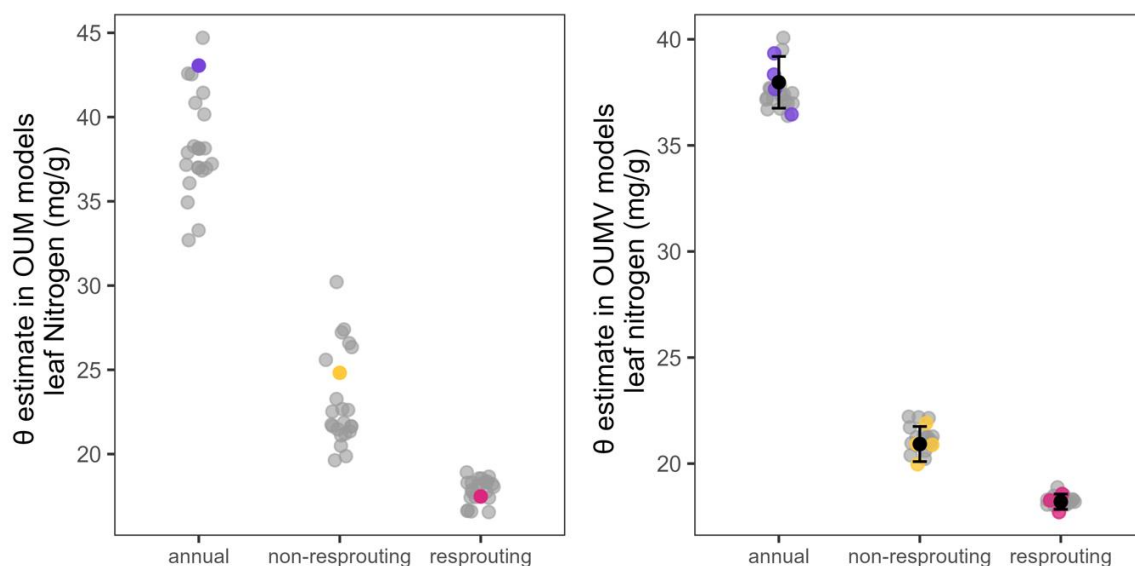


Figura S1: Ótimos fenotípicos (θ) estimados pelo modelo OUM (a esquerda) e OUMV (a direita) No gráfico. Cada ponto corresponde ao valor de θ estimado por cada modelo considerado o melhor, excluindo empates. As barras de erro correspondem ao desvio padrão entre as estimativas da árvore de consenso e os pontos cinzas são os valores de θ estimados para as 100 árvores filogenéticas alternativas.

CONCLUSÕES GERAIS

Esta tese investigou como diferentes mutualismos em plantas tropicais com ocorrência em ambientes abertos sazonais da América do Sul evoluíram. Por meio de uma abordagem macroevolutiva, combinamos dados da literatura, do campo e de herbário, para investigar como os mutualismos de defesa e nutrição se diversificaram e testamos se elas evoluíram junto outras dimensões do fenótipo vegetal, como a forma de vida, características foliares e nicho ambiental. A linhagem modelo do gênero *Chamaecrista* forneceu um sistema ideal para explorar essas relações, por reunir alta diversidade funcional, ampla distribuição em ambientes sazonais do Neotrópico e múltiplos tipos de mutualismos.

No Capítulo 1, mostramos que a evolução das formas de vida em *Chamaecrista* ocorreu junto com transições no nicho ambiental das espécies. Linhagens anuais (terófitas) evoluíram em ambientes mais secos e com frequência intermediárias de distúrbios, enquanto espécies perenes, especialmente as não rebrotantes (caméfitas e fanerófitas), estão associadas a ambientes com maior disponibilidade hídrica e menor frequência de fogo. Por outro lado, as perenes rebrotantes (geófitas), evoluíram nichos com maior disponibilidade de recursos e alta frequência de distúrbios. Esses padrões evidenciam uma associação evolutiva entre as formas de vida e os nichos ambientais, indicando que, ao longo da diversificação do grupo, mudanças nas estratégias ecológicas ocorreram conjuntamente com a ocupação de diferentes contextos ambientais. Ao refletirem adaptações integradas ao ambiente, essas estratégias constituem o pano de fundo ecológico e evolutivo sobre o qual os mutualismos se diversificaram.

No Capítulo 2, investigamos a evolução do mutualismo de defesa mediado por formigas e descobrimos que a evolução dos nectários extraflorais (NEFs) está integrada com a evolução de características funcionais da planta e com a disponibilidade hídrica do ambiente. Especificamente, espécies com maior investimento em construção foliar (maior LMA) e que ocorrem em ambientes menos áridos evoluíram NEFs maiores e mais atrativos para formigas. Em contraste, espécies anuais, com folhas com menor LMA e que ocupam nichos mais secos, possuem NEFs menores e menor interação com formigas. Esses resultados indicam que a evolução de características associadas ao mutualismo de defesa foi influenciada por um equilíbrio entre os custos de atrair formigas e os benefícios de evitar potenciais perdas associados à herbivoria. Assim, em espécies conservativas, com folhas estruturalmente mais caras de produzir, NEFs maiores e mais atrativos evoluíram, provavelmente como uma forma eficiente de defesa biótica. Em contraste, espécies aquisitivas, com tecidos foliares de baixo custo e alta rotatividade, evoluíram NEFs menores, consistentes com uma estratégia com menor investimento em defesa. Além disso, nossos resultados indicam que a disponibilidade

hídrica atua como uma restrição importante, limitando a evolução de NEFs maiores em ambientes mais secos, possivelmente por impor limites fisiológicos à produção de néctar. O padrão encontrado em nossos dados é compatível com as predições do modelo de equilíbrio crescimento-diferenciação (Herms e Mattson, 1992), segundo o qual plantas com crescimento rápido priorizam a expansão de biomassa em detrimento do investimento em defesa. Assim, nossos resultados indicam que os custos relativos da herbivoria, modulados pelas estratégias funcionais do espectro de crescimento rápido-lento, atuaram como forças seletivas importantes na evolução das características de defesa biótica. Em conjunto, os nossos resultados mostram um padrão de evolução coordenada entre investimento em defesa, custo de produção foliar e estratégia funcional das plantas.

Por fim, o Capítulo 3 focou na evolução do mutualismo nutricional com bactérias fixadoras de nitrogênio. Identificamos três padrões distintos nos ótimos fenotípicos para a intensidade de nodulação entre as formas de vida: espécies anuais possuem alta intensidade de nodulação, alto nitrogênio foliar e baixo LMA; as perenes não rebrotantes mantêm alta nodulação apesar do baixo teor de nitrogênio nas folhas e, as perenes rebrotantes, possuem baixa nodulação, baixo nitrogênio foliar e alto LMA. Esses resultados indicam que a intensidade da nodulação não evoluiu sob um único regime seletivo, mas sim sob diferentes contextos fisiológicos e ecológicos, refletindo múltiplas soluções adaptativas frente às demandas nutricionais e aos custos da simbiose. O teor de nitrogênio foliar, usado aqui como proxy da capacidade fotossintética das espécies, foi positivamente associado à intensidade da nodulação nas espécies anuais, sugerindo que plantas com metabolismo mais acelerado evoluíram associações mais intensas com bactérias fixadoras de nitrogênio. Em contraste, espécies com estratégias conservativas, como as perenes rebrotantes, evoluíram menor intensidade de nodulação e baixo teor de nitrogênio foliar, possivelmente por possuírem menor demanda metabólica e maior capacidade de retenção de nutrientes em estruturas de reserva. Já as espécies perenes não rebrotantes evoluíram alta intensidade de nodulação mesmo com baixos teores de nitrogênio nas folhas. Essa descoberta sugere que, apesar de uma menor capacidade fotossintética quando comparada com as anuais, essas linhagens podem obter benefícios líquidos suficientemente altos, compensando os custos associados a simbiose. A nodulação, portanto, é uma característica evolutivamente lábil, cuja manutenção e intensidade dependem da interação entre metabolismo vegetal, disponibilidade ambiental de nutrientes e estratégia funcional da planta. Esse padrão está em acordo com modelos teóricos que preveem que o investimento simbiótico será favorecido quando os benefícios nutricionais superam os custos energéticos de sustentar a simbiose, o que depende tanto da eficiência dos simbiontes quanto da capacidade da planta em manter uma alta taxa de assimilação de

carbono (Kiers et al. 2003; Kobayashi et al. 2021). Assim, nossos resultados evidenciam que a evolução da nodulação em *Chamaecrista* é condicionada por múltiplos regimes adaptativos, moldados por interações complexas entre limitações ambientais, alocação de recursos e características fisiológicas das plantas.

O resultado dos três capítulos converge para a ideia de que os mutualismos não evoluem de forma isolada, mas são moldados por múltiplas pressões seletivas que podem interagir entre si. Neste trabalho fornecemos evidências empíricas para modelos teóricos que preveem que a evolução dos mutualismos depende dos benefícios líquidos das interações e estes benefícios estão associados ao metabolismo e capacidade da planta em sustentar os custos da interação em contextos ambientais específicos. Mutualismos de defesa e nutrição impõem exigências distintas sobre o metabolismo vegetal, e o investimento e a evolução em cada tipo de mutualismo está associado a diferentes componentes do espectro econômico das plantas. Por exemplo, a evolução de estratégias aquisitivas em nosso grupo focal favoreceu a evolução de mutualismos nutricionais enquanto a evolução de estratégias conservativas favoreceu a evolução de mutualismos de defesa. Embora ambos os mutualismos envolvam produtos derivados da fotossíntese, eles diferem nos custos metabólicos associado para as plantas. Os mutualismos de defesa, como aqueles mediados por nectários extraflorais, geralmente demandam menor investimento metabólico, ao passo que mutualismos nutricionais com bactérias fixadoras de nitrogênio impõem custos mais elevados e envolvem complexos mecanismos de regulação. Esse contraste sugere que mutualismos de defesa tendem a evoluir mesmo quando o metabolismo da planta é mais baixo, enquanto mutualismos de nutrição dependem fortemente da capacidade da planta em sustentar o custo fisiológico da simbiose. Assim, diferentes combinações de características funcionais, necessidades metabólicas e contextos ambientais podem ter interagido ao longo da história evolutiva das linhagens, resultando em trajetórias divergentes na interação com parceiros.

Nossos resultados reforçam que ambientes abertos e sazonais, marcados por restrições de recursos e frequência de distúrbios, impõem filtros seletivos que moldam não apenas a evolução das estratégias ecológicas das plantas, mas também as interações mutualistas que elas mantêm e evoluem. Por fim, embora nossos resultados avancem na compreensão da evolução dos mutualismos, ainda há muito trabalho a ser realizado. Investigamos separadamente a evolução da nodulação e dos nectários extraflorais, mas não examinamos explicitamente como essas interações coexistem ou interagem ao longo da história evolutiva das espécies. Investigar possíveis *trade-offs* ou sinergias entre diferentes mutualismos pode nos ajudar a compreender como múltiplas interações se combinam, competem ou se reforçam, e como isso influencia o desempenho, a persistência e a evolução das espécies vegetais.

Questões fundamentais permanecem em aberto, por exemplo, sob quais condições múltiplos mutualismos coexistem, se excluem ou são favorecidos simultaneamente? Quais mecanismos fisiológicos regulam o investimento em mutualismos com custos e benefícios distintos? E até que ponto essas interações moldam a capacidade das espécies de colonizar novos ambientes ou persistir frente às mudanças climáticas? Responder a essas perguntas exige abordagens integrativas e comparativas que combinem dados ecológicos, funcionais e filogenéticos. Estudos ecológicos comparando populações com diferentes combinações de mutualismos, bem como experimentos em casa de vegetação que manipulem a presença, a intensidade ou a eficácia das interações sob diferentes contextos ambientais, podem revelar os mecanismos funcionais e seletivos envolvidos na coexistência e evolução desses sistemas. Assim, ao integrar diferente tipos de abordagem e de dados, poderemos avançar na compreensão dos fatores que moldam a evolução das interações mutualistas nas plantas, contribuindo para elucidar os princípios gerais que regem a complexidade das adaptações ecológicas ao longo do tempo.

Referências

- Harms, D. A., and W. J. Mattson. 1992. The dilemma of plants: to grow or defend. *Q Rev Biol* 67:283–335.
- Kiers, E. T., T. M. Palmer, A. R. Ives, J. F. Bruno, and J. L. Bronstein. 2010. Mutualisms in a changing world: An evolutionary perspective. *Ecol Lett* 13:1459–1474.
- Kobayashi, R., S. Yamaguchi, and Y. Iwasa. 2021. Optimal control of root nodulation – Prediction of life history theory of a mutualistic system. *J Theor Biol* 510. Academic Press.