



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

Felipe Wanderley Amorim

A flora esfingófila de uma Floresta Ombrófila Densa Montana
no sudeste brasileiro e relações mutualísticas com a fauna de
Sphingidae

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Felipe Wanderley Amorim
Marlies Sazima
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para a obtenção do título
de Doutor em Biologia Vegetal.

Orientadora: Profa. Dra. Marlies Sazima

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Am68f	Amorim, Felipe Wanderley, 1982- A flora esfingófila de uma floresta ombrófila densa montana no sudeste brasileiro e relações mutualísticas com a fauna de <i>Sphingidae</i> / Felipe Wanderley Amorim. – Campinas, SP: [s.n.], 2012. Orientador: Marlies Sazima. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. 1. Plantas - Reprodução. 2. Polinização. 3. Néctar. 4. Floresta ombrófila densa montana. 5. <i>Sphingidae</i>. I. Sazima, Marlies, 1944-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.
-------	---

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: The sphingophilous flora of a highland atlantic rainforest in the southeastern Brazil and mutualistic relationships with the *Sphingidae* fauna

Palavras-chave em Inglês:

Plants - Reproduction

Pollination

Nectar

Montane dense ombrophilous forest

Sphingidae

Área de concentração: Biologia Vegetal

Titulação: Doutor em Biologia Vegetal

Banca examinadora:

Marlies Sazima [Orientador]

Kayna Agostini

Paulo Eugênio Oliveira

Santiago Benitez-Vieyra

Wesley Rodrigues Silva

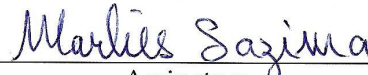
Data da defesa: 17-08-2012

Programa de Pós Graduação: Biologia Vegetal

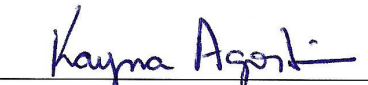
Campinas, 17 de agosto de 2012.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Marlies Sazima (Orientadora)


Assinatura

Profa. Dra. Kayna Agostini


Assinatura

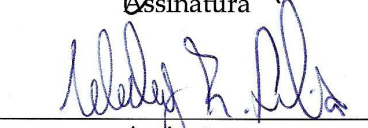
Prof. Dr. Paulo Eugênio Alves Macedo de Oliveira


Assinatura

Dr. Santiago Miguel Benitez Vieyra


Assinatura

Prof. Dr. Wesley Rodrigues Silva


Assinatura

Profa. Dra. Eliana Regina Forni Martins

Assinatura

Prof. Dr. João Semir

Assinatura

Profa. Dra. Márcia Alexandra Rocca de Andrade

Assinatura

ACREDITA?

*SIM,
EU ACREDITO EM MARIPOSAS NOTURNAS...
TAMBÉM ACREDITO EM FADAS E
NO PETER PAN.*

*ACREDITO EM CHEIROS, GOSTOS,
SENSAÇÕES, EMOÇÕES E
ATÉ MESMO EM ILUSÕES.*

*ACREDITO NA ALEGRIA ENTRE OS POVOS,
NO SORRISO, NAS LÁGRIMAS E
NA FORÇA DO ABRAÇO EM UNIR PESSOAS
EM UM SÓ CORAÇÃO.*

*ACREDITO NA SOLIDARIEDADE,
NA IGUALDADE, FRATERNIDADE, PACIFICIDADE...
ACREDITO NA FORÇA DA AMIZADE.*

*ACREDITO NO PODER DA PALAVRA DE
UM AMIGO AINDA QUE DISTANTE.
ACREDITO NA AUSÊNCIA DESTAS PALAVRAS
QUANDO TRANSFORMADAS APENAS
NA MAGIA DE UM OLHAR.*

*CONTINUO ACREDITANDO EM MARIPOSAS NOTURNAS,
ACREDITO ATÉ QUE ELAS POLINIZAM!
OU POLIMERIZAM COMO QUEIRAM ACREDITAR.
MAS, TAMBÉM ACREDITO NA DÚVIDA
COMO FORÇA MOTRIZ NA BUSCA PELA VERDADE.*

*ACREDITO NA POESIA COMO ARMA,
NO CARINHO COMO MUNIÇÃO,
NOS CORAÇÕES COMO ALVOS E
ACREDITO NO AMOR COMO SOLUÇÃO.*

SIM, EU ACREDITO!

*Aos meus amores por me fazerem acreditar:
Vó, Mãe, Dani, Luiz Felipe e Ana.*



Adaptado de: <http://www.umsabadoqualquer.com>

AGRADECIMENTOS

Tarefa talvez tão difícil quanto aquela de redigir um capítulo é a de tentar expressar em poucas palavras a tamanha gratidão que sinto por muitas pessoas, sem as quais, indubitavelmente não teria sido possível realizar este trabalho.

Gostaria de agradecer a FAPESP pelo apoio financeiro a este estudo (Processo: 2007/58666-3) no âmbito do Projeto Temático Gradiente Funcional dentro do Programa Biota/FAPESP e aos coordenadores do Biota Gradiente Funcional, Dr. Carlos A. Joly e Dr. Luiz A. Martinelli, por todo apoio prestado. Agradeço ao Instituto Florestal e SISBIO pela permissão para a realização do trabalho de campo. Gostaria também de agradecer ao meu Assessor anônimo da FAPESP, por ter acreditado no projeto que deu origem a este trabalho e por ter colaborado ano a ano, em cada relatório, para a melhoria deste estudo.

Agradeço a todos os amigos que constituem a equipe de funcionários do Núcleo Santa Virgínia no Parque Estadual da Serra do Mar, por todo apoio logístico e ajuda nos trabalhos de campo e também por terem tornado muito mais alegres os meus dias de trabalho naquele paraíso chamado Santa Virgínia. Em especial agradeço ao Vagner por ter me ajudado literalmente noite e dia, além de muitas madrugadas, nos estudos que compõem cada um dos capítulos desta tese.

Agradeço a todos os professores e funcionários do Departamento de Biologia Vegetal do Instituto de Biologia da Unicamp, pelo apoio direto ou indireto na minha formação dentro dessa instituição. Sou muito grato ao Prof. João Semir pelas identificações de grande parte das plantas e pelas ótimas conversas e muitas risadas. Agradeço muitíssimo a Maria Roseli, secretária do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, por ter sido tão atenciosa e prestativa em todos os momentos em que precisei de sua ajuda desde a minha chegada à Unicamp.

Agradeço a todos os amigos da Biossistemática (André, Ana, Carol, Coquinho, Fer, Graham, Iara, Jef, Klênia, Lori, Mau, Nair, Pedro, Pietro, Rafa Taíssa, Vanessa e Vini) por todas as discussões que ajudaram na construção deste trabalho e pelo ótimo convívio dentro e fora do ambiente do laboratório.

Agradezco a los amigos que me han recibido en Argentina durante mi pasantía en la Universidad Nacional de Córdoba. En particular agradezco a Nene y toda su familia por haberme recibido como un hijo en su casa, también a Marce, Santi, Leo, Caro, Andrea y Alicia. Dejo mi gratitud por la amistad a todos los chicos de los laboratorios de Andrea Cocucci y Leonardo Galetto.

Obrigado aos amigos do LAMОВI (Adriana, Clesnan, Diana, Julia e Marcela) por terem estado presentes neste trabalho, mesmo que distantes, e por terem me recebido de braços abertos sempre que retornei a UFU. Falando em UFU, não poderia deixar de agradecer a essa Universidade, da qual me orgulho de ser filho acadêmico. Agradeço a cada professor que tive naquela Universidade, por ter me proporcionado uma formação muito sólida na minha graduação e mestrado. De maneira muito especial, gostaria de agradecer ao Prof. Paulo Eugênio Oliveira, meu orientador na Iniciação Científica e no Mestrado, por ter sido uma das pessoas mais importantes na formação da minha carreira acadêmica.

À querida Profa. Marlies Sazima, minha orientadora no doutorado, me faltam as palavras, e até mesmo o fôlego, para expressar minha eterna gratidão. Obrigado Marlies, por tanta paciência (muuuuita paciência!!), por tamanha dedicação e carinho, e por ter contribuído de maneira substancial com a minha formação acadêmica, e mais importante, com a minha formação como pessoa.

Aos amigos com quem eu pude compartilhar o lar doce lar durante a vida em Campinas também deixo minha gratidão e carinho: André, Gasta, Jef, Larissinha, Leo, Lígia, Lindomar, Lori, Marcelão, Mau, Pietro e Tomatinho. Aos amigos do departamento de Biologia Vegetal também deixo meus sinceros agradecimentos pelo convívio, discussões, ajudas diversas e também pelas festas muito divertidas!

A Cris Baldauf por sua sincera amizade, carinho e pelas ótimas conversas regadas a muitas risadas que me trouxeram paz quando eu muito precisava! A Lori por ser minha irmãzinha querida de Campinas. A Kayna pelo exemplo de amor àquilo que faz e pelos importantes incentivos em dois momentos cruciais desta trajetória: o início e o fim do doutorado. Obrigado por ser a irmã mais velha Kayna, e por contribuir com meu crescimento!! Ao amigo trazido pela academia e herdado pela vida, Pietro, que tem sido um grande companheiro nesta jornada e por contribuir e orgulhar-se de cada pequena conquista

que tenho em quaisquer aspectos da vida, como se fossem suas, dando verdadeiro sentido a palavra amizade. Obrigado Pietro e também sua família: Dário, Izumi, Mayara, tia Bá e tio Ivo.

Ao Dr. Antenor, um amigo do peito que os esfingídeos sem querer, um dia me trouxeram de presente. Muito obrigado pela torcida, pelo carinho paterno e por ter dado asas para que eu pudesse alçar voo e vir para Campinas dar início ao trabalho com estas incríveis mariposas que tanto admiramos e que resultou nesta tese. Ao estimado amigo, também dedico esta obra.

Agradeço a toda minha família, tios, primos e padrinhos, que têm me acompanhado e torcido por mim mesmo que distantes.

Minha enorme gratidão a minha família Uberlandense, a família de Brito, sem os quais eu não teria tido a menor condição de fazer este trabalho. Obrigado Dna. Maria, Seu Geraldo e os meus queridos irmãos: Leandro, Lemir, Eleusa, Emília, Marilene e Elaine, por terem adotado minha família como parte da sua!

As minhas amadas Vó e Mãe, só posso dizer que sem vocês, nada disso teria sentido e eu nunca teria tido a menor chance de chegar nem perto de onde estou. Somente pude chegar até aqui, graças ao alicerce e todo amor que vocês me deram desde o primeiro instante da minha vida, me ensinando a ser uma pessoa de bem e um homem de caráter. Às minhas maiores torcedoras dedico não apenas este trabalho, mas sim, tudo que sou.

A minha amada irmã agradeço por todo amor, carinho e cumplicidade. Agradeço à Dani também, por ter trazido o Luiz Felipe para as nossas vidas e por ter lutado pela vida do nosso pequeno, o qual nos deu um novo significado para a palavra amar.

Como havia dito no início, indubitavelmente, sem a presença de várias pessoas não teria sido possível realizar este trabalho. Certamente, sem a presença da Ana na minha vida durante a fase mais crítica desta longa jornada que foi fazer um doutorado, talvez eu não tivesse tido forças para finalizá-lo. Levantar a cabeça e superar o pesadelo de ter perdido grande parte da tese e dos backups em dois furtos a residência consecutivos, ocorridos em dois países distintos durante a reta final do doutorado, somente foi possível com o amor, carinho e dedicação da minha amada companheira Ana. Obrigado Ana, por ter tornado esta conquista possível!!

ÍNDICE

RESUMO	1
ABSTRACT	2
INTRODUÇÃO GERAL	3
CAPÍTULO I	
Esfingofilia na Mata Atlântica: relações fenológicas e morfológicas entre esfingídeos e plantas	11
CAPÍTULO II	
Diversidade e composição faunística de Sphingidae na Mata Atlântica	47
CAPÍTULO III	
Pollination contrivances of long-tubed sphingophilous plants in an Atlantic Rainforest of southeastern Brazil	78
CAPÍTULO IV	
Armament Imbalances: Match and mismatch in plant-pollinator traits of highly specialized long-spurred orchids	113
CAPÍTULO V	
Beyond the pollination syndrome: Nectar ecology and the role of diurnal and nocturnal pollinators in the reproductive success of <i>Inga sessilis</i> (Fabaceae)	137
CONSIDERAÇÕES FINAIS	168

RESUMO

Polinização por esfingídeos é provavelmente um dos sistemas menos estudados em comunidades tropicais, especialmente na Mata Atlântica, que constitui um dos biomas mais diversos e ameaçados do planeta. Foram estudadas a flora esfingófila e a fauna de Sphingidae em uma área de Floresta Ombrófila Densa Montana (FODM) e analisados os processos ecológicos subjacentes às interações entre esfingídeos e plantas. Ao todo 24 espécies compuseram a flora esfingófila da área estudada, dentre as quais, quatro espécies possuem adaptações estritas à polinização por esfingídeos. A fauna de esfingídeos foi composta por 50 espécies com grande predomínio de mariposas com probóscides curtas. Plantas e esfingídeos apresentaram ajustamento morfológico significativo na distribuição dos comprimentos de tubos florais e de probóscides, porém ao contrário do padrão geral de outras áreas na região Neotropical, não houve ajustamento fenológico estrito entre esfingídeos e plantas na Mata Atlântica. A presença sazonal de mariposas com longas probóscides na área está relacionada principalmente a emigração de espécies oriundas de ecossistemas adjacentes à FODM. Limitação de polinizadores foi comum nas espécies vegetais mais especializadas o que limitou a produção de frutos. Os processos de seleção mediada por polinizadores nestas espécies, também foram afetados. Porém, processos locais de seleção mediada por polinizadores, provavelmente devem agir na estruturação de ajustamentos morfológicos entre esfingídeos e plantas, mesmo sendo variáveis no tempo e no espaço, conforme sugerem os resultados. Apesar da ausência de ajustamento fenológico estrito entre esfingídeos e plantas na Mata Atlântica, o padrão geral registrado em outros biomas sugere ocorrência de esfingídeos de longas probóscides coincidente com a floração de espécies esfingófilas com longos tubos florais. Como este grupo de plantas oferece maior quantidade de néctar em um “nicho privado” aos esfingídeos de longas probóscides, esse ajustamento fenológico poderia ser visto como estratégia para minimizar a competição por recursos florais entre mariposas com probóscides longas e curtas nas comunidades de Sphingidae.

ABSTRACT

Hawkmoth pollination is probably one of the least studied pollination systems in tropical communities, particularly in the Atlantic Rainforest, one of the most diverse and threatened biomes in the world. In this work we studied the sphingophilous plants and the Sphingidae fauna in an area of Highland Atlantic Rainforest (HARF) and analyzed the ecological processes underlying the interactions between plants and hawkmoths. Altogether, 24 species composed the sphingophilous flora recorded to the study site, among which four species had strict adaptations related to hawkmoth pollination. The hawkmoth fauna was composed of 50 species with great predominance of short-tongued moths. Hawkmoths and plants showed a significant morphological match in the distribution of floral tubes and proboscises lengths, but unlike the general pattern obtained for other areas in the Neotropical region, we did not record a strict phenological match between hawkmoths and plants in the Atlantic Rainforest. The seasonal occurrence of long-tongued moths in the study site is related mainly to the income of migrating species from adjacent ecosystems to the HARF. Pollinator-limitation was common in the most specialized sphingophilous plants limiting fruit-set. Pollinator-mediated selection processes in highly specialized species were also impaired. However, local processes of pollinator-mediated selection may operate structuring the morphological match between hawkmoths and plants in spite of being variable in time and space, as suggested by the results. Despite the absence of a strict phenological match between hawkmoths and plants in the Atlantic Rainforest, the general pattern recorded to other analyzed biomes suggests a concurrence of long-tongued hawkmoths and long-tubed flowers through the phenological time. Since this group of plants offers greater amounts of nectar in a "private niche" where only long-tongued hawkmoths can have access, such phenological match could be viewed as a strategy to reduce competition for floral resources between long- and short-tongued moths in the Sphingidae community.

INTRODUÇÃO GERAL

As interações mutualísticas entre plantas e polinizadores são tidas como uma das principais hipóteses para explicar a abrupta radiação e diversificação das Angiospermas (Grimaldi 1999, Lunau 2004, Friedman 2009, Niet & Johnson 2012). Essas interações promovem adaptações recíprocas entre os traços morfofisiológicos de flores e polinizadores (Waser *et al.* 1996, Altshuler & Clark 2003, Temeles & Kress 2003), as quais podem estabelecer relações tão estreitas, ao ponto de serem reconhecidas como processos coevolutivos (Nilsson 1988, Anderson & Johnson 2008). A polinização por mariposas Sphingidae têm despertado a atenção e interesse de naturalistas desde as clássicas observações de Darwin no século XIX. Ao comentar sobre o mecanismo de polinização da orquídea malgaxe *Angraecum sesquipedale*, cujos tubos florais alcançam até 30 cm de comprimento, Darwin (1862) predisse a existência de um polinizador ainda desconhecido para esta planta:

...“*I must say a few words on the Angraecum sesquipedale, of which the large six-rayed flowers, like stars formed of snow-white wax, have excited the admiration of travellers in Madagascar.*” ... “*I found the nectaries eleven and a half inches long, with only the lower inch and a half filled with very sweet nectar. What can be the use, it may be asked, of a nectary of such disproportional length? We shall, I think, see that the fertilisation of the plant depends on this length and on the nectar being contained only within the lower and attenuated extremity. It is, however, surprising that any insect should be able to reach the nectar: our English sphinxes have probosces as long as their bodies; but in Madagascar there must be moths with probosces capable of extension to a length of between ten and eleven inches!*”... (*On the various contrivances by which British and foreign orchids are fertilised by insects and on the good effects of intercrossing*: páginas 197-198).

Nos anos que seguiram essa predição, a existência da “mariposa de Darwin”, contudo, permaneceu controversa e muito criticada pelos naturalistas contemporâneos. Porém, a possível existência deste esfingídeo foi endossada por A.R. Wallace (1867):

...“I may here mention that some of the large *Sphinx* moths of the tropics have probosces nearly as long as the nectary of *Angræcum sesquipedale*. I have carefully measured the proboscis of a specimen of *Macrosila cluentius* from South America in the collection of the British Museum, and find it to be nine inches and a quarter long! One from tropical Africa (*Macrosila morgani*) is seven inches and a half. A species having a proboscis two or three inches longer could reach the nectar in the largest flowers of *Angræcum sesquipedale*, whose nectaries vary in length from ten to fourteen inches. That such a moth exists in Madagascar may be safely predicted; and naturalists who visit that island should search for it with as much confidence as astronomers searched for the planet Neptune, and they will be equally successful!” ... (Creation by law: página 477) (Fig. 1).

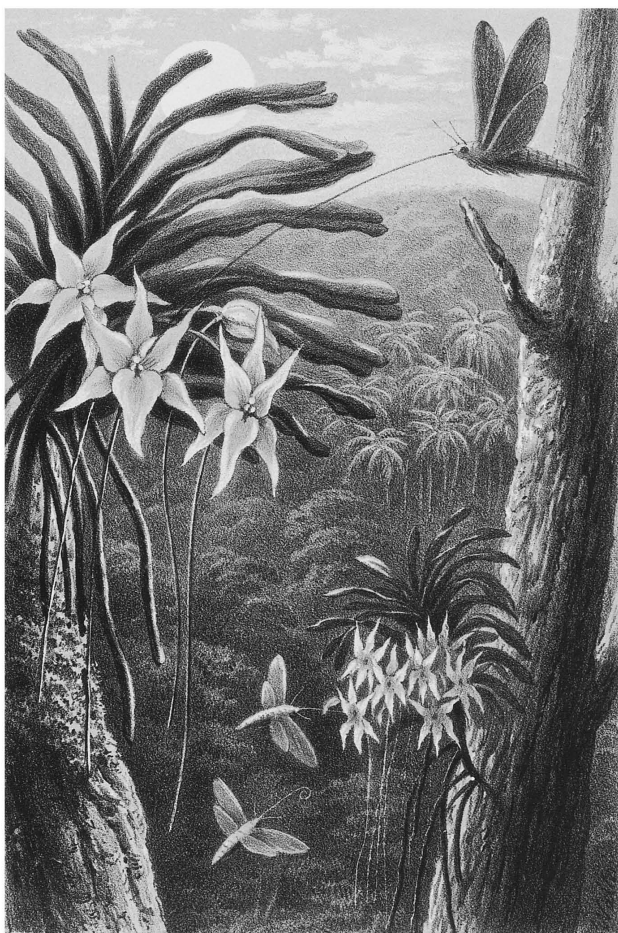


Figura 1. Representação artística da polinização de *Agræcum sesquipedale* pela “mariposa de Darwin” em Madagascar. Extraído de Wallace (1967), página 471. Ilustração de T.W. Wood.

Similarmente, Hermann Müller (1873) defendeu a hipótese de Darwin mencionando a descoberta de seu irmão Fritz Müller, de um esfingídeo no Brasil com probóscide de cerca de 30 cm de comprimento (apesar de não haver referência de qual espécie se tratava é possível que fosse um exemplar de *Amphimoea walkeri* ou *Neococytius cluentius*). Todavia, somente 41 anos após a predição de Darwin, Rothschild & Jordan (1903) encontraram uma subespécie de esfingídeo em Madagascar cuja probóscide era compatível com aquela da “mariposa de Darwin”, tendo sido descrita como *Xanthopan morgani praedicta*.

A polinização de orquídeas esfingófilas, como *A. sesquipedale*, depende de um acoplamento mecânico entre a cabeça do polinizador e das peças reprodutivas da flor. Logo, mariposas com probóscides mais longas que os tubos florais são capazes de acessar o néctar, porém não atuam como polinizadores por não contatarem as peças reprodutivas. Por outro lado, ao visitarem flores com tubos florais mais profundos que o comprimento da probóscide, a mariposa poliniza efetivamente a flor, porém não alcança o néctar. Esta dinâmica na interação deu origem a duas hipóteses concorrentes para explicar a evolução de longas probóscides e longos tubos florais.

A primeira hipótese, proposta por Nilsson (1988), segue o modelo clássico Darwiniano de “corrida coevolutiva”, na qual esta demanda conflitiva entre a planta e o polinizador resultaria em um alongamento gradual dos tubos florais e das probóscides. Por outro lado, a segunda hipótese proposta por Wasserthal (1997), propõe um modelo de “troca de polinizadores”, no qual plantas se adaptam a novos polinizadores com probóscides mais longas que as dos polinizadores originais. Como a polinização requer o acoplamento mecânico flor-polinizador, a associação a este novo polinizador com probóscide mais longa resultaria em rápida seleção de indivíduos com tubos florais mais longos na população.

Mais recentemente foi lançada outra hipótese, como um terceiro modelo alternativo para explicar este processo de coevolução. Esta hipótese propõe um modelo de competição por recursos, como principal fator que desencadearia a evolução de longas probóscides e consequentemente, de

longos tubos florais (Rodríguez-Gironés & Santamaría 2007, Rodríguez & Llandres 2008). Por meio de modelagens matemáticas, esta proposta pondera que competição entre polinizadores com probóscides longas e curtas leva a partição de recursos entre ambos os grupos de polinizadores por meio da estratégia de forrageamento ótimo. Ao longo de gerações sucessivas, o grupo de polinizadores com probóscides longas sofreria alongamento progressivo no comprimento das probóscides, devido ao aumento na eficiência de forrageamento. Devido ao acoplamento mecânico flor-polinizador necessário à polinização, a seleção favoreceria o alongamento paralelo dos tubos florais. Estas plantas por sua vez, experimentariam maior eficiência na polinização através do aumento na constância floral via especialização em um grupo menor de polinizadores.

A despeito do elevado grau de especialização por parte de algumas espécies esfingófilas, a maioria das interações entre plantas e polinizadores é altamente assimétrica. Essas interações estão organizadas em redes complexas, nas quais cada espécie evolui em resposta às interações com outros grupos de espécies através de sua área de distribuição estabelecendo processos coevolutivos difusos (Thompson 2005, Bascompte *et al.* 2006, Pauw *et al.* 2009). Muitas espécies de plantas e de polinizadores com ampla distribuição geográfica apresentam variações nos traços morfológicos envolvidos em suas interações com outras espécies (*e.g.* Herrera *et al.* 2006, Anderson & Johnson 2008, Brunet 2009, Pauw *et al.* 2009). Essas variações possibilitam a ocorrência de distintos processos locais de seleção natural, nos quais as espécies interagentes tornam-se localmente adaptadas entre si resultando em um mosaico geográfico de seleção (Thompson 2005, Herrera *et al.* 2006, Anderson & Johnson 2008, Pauw *et al.* 2009).

Polinizadores possuem papel fundamental na evolução da morfologia floral (Stebbins 1970, Temeles & Kress 2003, Kay *et al.* 2006). Especialmente em plantas polinizadas por visitantes com longos aparelhos bucais, como esfingídeos, as quais dependem da correspondência morfológica entre o tubo floral e o aparelho bucal do polinizador, processos locais de seleção natural possuem importante papel no ajustamento das morfologias planta-polinizador (Nilsson *et al.* 1987, Johnson & Steiner 1997,

Maad 2000, Maad & Alexandersson 2004, Maad & Nilsson 2004). Entretanto, pouco se sabe acerca do papel destes processos locais sobre a estruturação das interações entre plantas e polinizadores dentro de um contexto de comunidade.

A Mata Atlântica é um dos biomas mais ricos, diversos e ameaçados do planeta. Contudo, entre os diversos estudos sobre ecologia da polinização conduzidos nas últimas décadas neste bioma, pouca atenção tem sido prestada aos sistemas de polinização noturnos, especialmente aos polinizadores invertebrados como as mariposas da família Sphingidae. Logo, pouco se conhece sobre as interações entre esfingídeos e plantas dentro do conjunto de ecossistemas que constituem a Mata Atlântica e quais são os processos ecológicos subjacentes a estas interações. Neste sentido, o presente estudo teve como objetivos descrever a flora esfingófila e a fauna de esfingídeos em uma área de Floresta Ombrófila Densa Montana no Núcleo Santa Virgínia, Parque Estadual da Serra do Mar - São Paulo, assim como, analisar os processos ecológicos subjacentes às interações entre esfingídeos e plantas esfingófilas neste ecossistema.

No **CAPÍTULO I** é apresentada a flora esfingófila do Núcleo Santa Virgínia (NSV), seu padrão de floração, sistema reprodutivo, características morfológicas e do néctar, assim como analisado em contexto local e regional (através de comparações com outras áreas na região Neotropical), o ajustamento na fenologia e na morfologia dos aparelhos bucais dos esfingídeos e dos tubos florais das plantas esfingófilas. No **CAPÍTULO II** é descrita a composição faunística e os padrões de diversidade de Sphingidae no NSV e na Mata Atlântica como um todo (a partir de levantamentos da literatura), assim como discutida a influência dos ecossistemas adjacentes na Serra do Mar, sobre a fenologia e dinâmica faunística de Sphingidae na Floresta Ombrófila Densa Montana. No **CAPÍTULO III** deste estudo, são apresentados estudos detalhados sobre os mecanismos reprodutivos e artifícios florais que envolvem a polinização de espécies esfingófilas altamente especializadas na Mata Atlântica. No **CAPÍTULO IV** é apresentado o primeiro estudo sobre seleção mediada por polinizadores em orquídeas esfingófilas

altamente especializadas na região Neotropical. Na última parte deste estudo, **CAPÍTULO V**, é testado o papel de polinizadores diurnos e noturnos sobre o sucesso reprodutivo de uma espécie autoincompatível, com sistema de polinização misto e discutido que as adaptações aos polinizadores vão além da síndrome de polinização inferida somente pela morfologia floral.

ÁREA DE ESTUDO

O presente estudo foi desenvolvido no âmbito do Projeto Temático Gradiente Funcional dentro do Programa BIOTA/FAPESP, criado em 2005 com o objetivo de melhor compreender a Floresta Ombrófila Densa Atlântica e caracterizar a biodiversidade do Estado de São Paulo, definindo os mecanismos para sua conservação, seu potencial econômico e sua utilização sustentável. O Projeto Temático Gradiente Funcional, foi desenvolvido no Parque Estadual da Serra do Mar nos Núcleos Picinguaba (área de Floresta Ombrófila Densa de Terras Baixas) e Santa Virgínia (Floresta Ombrófila Densa Montana). O presente estudo foi realizado no Núcleo Santa Virgínia - NSV (23°17' – 23°24' S / 45°03' – 45°11' W, Fig. 1), Parque Estadual da Serra do Mar – PESM, entre os anos de 2008 e 2012. A área total do NSV possui cerca de 5.000 ha e está situada entre os municípios de São Luiz do Paraitinga, Cunha e Ubatuba, no estado de São Paulo (Veloso *et al.* 1991). A altitude varia de 850 m a 1.200 m a.n.m. e o clima é tipo Tropical Temperado (Cwa conforme Köppen 1948), com precipitação média anual superior a 2.000 mm, sendo que mesmo nos meses mais secos (abril a setembro) a precipitação nunca é inferior a 60 mm (Joly *et al.* 2012). A flora esfingófila foi inventariada ao longo de aproximadamente 60 km de transectos, que incluíram trilhas pré-estabelecidas no interior da floresta (trilhas: da Pirapitinga, do Poço do Pito, do Pau de Bala, do Ipiranga) estradas rurais nas dependências do NSV (estrada de acesso à sede do NSV e estrada de acesso à base da Vargem Grande), além de um trecho de 15 km da rodovia Oswaldo Cruz que corta a área do NSV.

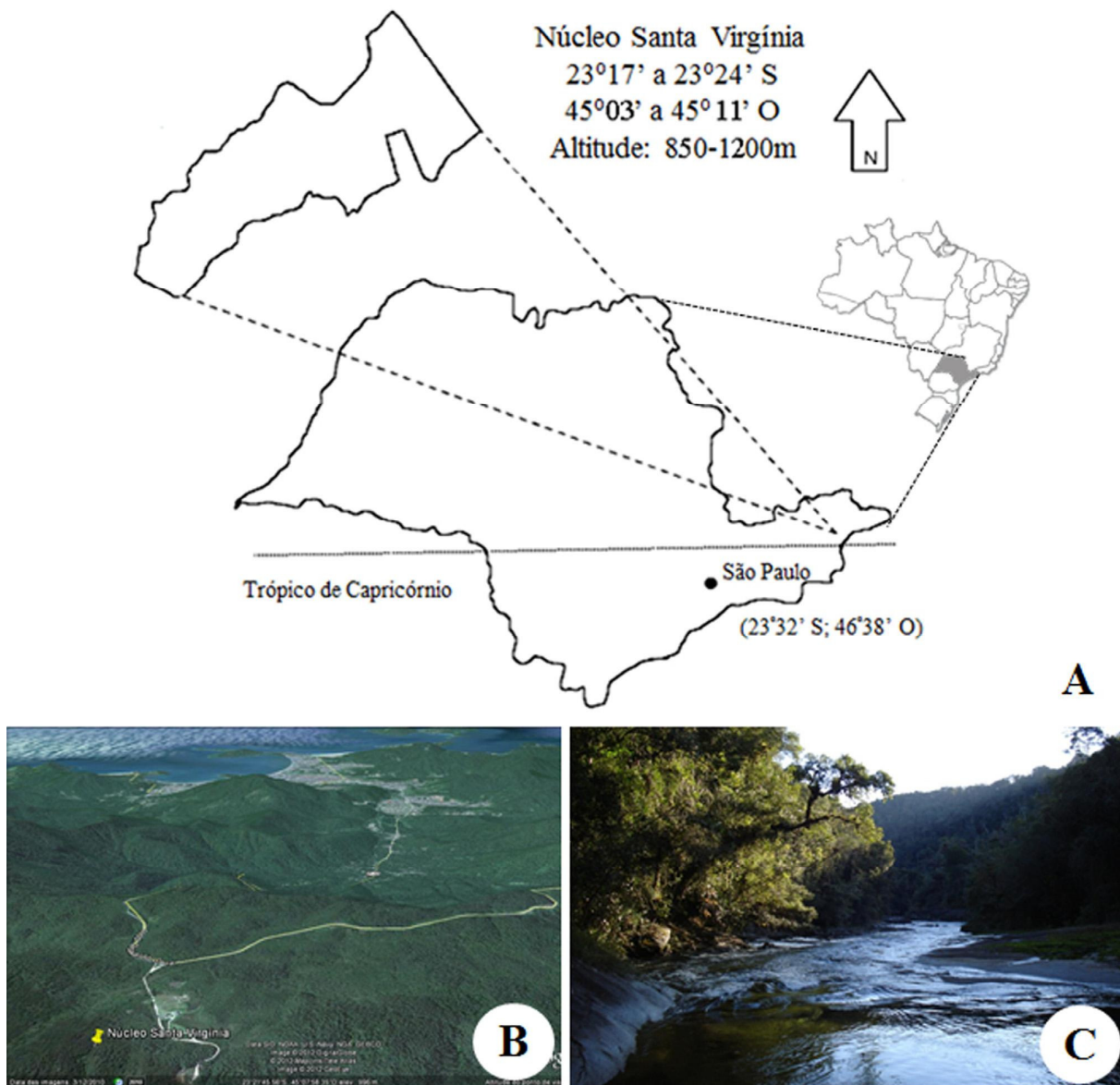


Figura 1. Descrição da área de estudos. **A.** Localização do Núcleo Santa Virgínia no Estado de São Paulo. **B.** Aspecto geral da Floresta Ombrófila Densa Montana a partir de uma imagem de satélite (retirada do Google Earth®) da área do Núcleo Santa Virgínia. Note a Rodovia Oswaldo Cruz (linha em amarelo) atravessando a área do Núcleo. **C.** Aspecto geral do interior da Floresta Ombrófila Densa Montana no Núcleo Santa Virgínia.

REFERÊNCIAS

- Altshuler DL, Clark CJ.** 2003. Darwin's Hummingbirds. *Science* **300**: 588–589.
- Anderson B, Johnson SD.** 2008. The geographical mosaic of coevolution in a plant-pollinator mutualism. *Evolution* **62**: 220–225.
- Bascompte J, Jordano P, Olesen JM.** 2006. Asymmetric coevolutionary networks facilitate biodiversity maintenance. *Science* **312**: 431–433.
- Brunet J.** 2009. Pollinators of the Rocky Mountain columbine: temporal variation, functional groups and associations with floral traits. *Annals of Botany* **103**:1567–1578.
- Darwin C.** 1862. *On the various contrivances by which British and foreign orchids are fertilised by insects and on the good effects of intercrossings*. New York: D. Appleton.
- Friedman WE.** 2009. The meaning of Darwin's "abominable mystery." *American Journal of Botany* **96**: 5–21.
- Grimaldi D.** 1999. The co-radiations of pollinating insects and angiosperms in the Cretaceous. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **86**: 373–406.
- Herrera CM.** 1990. The adaptedness of the floral phenotype in a relict endemic, hawkmoth-pollinated violet. 1. Patterns of variation among disjunct populations. *Biological Journal of the Linnean Society* **40**: 275–91.
- Johnson SD, Steiner KE.** 1997. Long-tongued fly pollination and evolution of floral spur length in the *Disa draconis* complex (Orchidaceae). *Evolution* **51**: 45–53.
- Joly CA, Assis MA, Bernacci LC, Tamashiro JY, Campos MCR, Gomes JAMA, et al.** 2012. Floristic and phytosociology in permanent plots of the Atlantic Rainforest along an altitudinal gradient in southeastern Brazil. *Biota Neotropica* **12**: 123–145

- Kay KM, Voelckel C, Yang JY, Hufford KM, Kaska DD, Hodges SA.** 2006. Floral characters and species diversification. In: Harder LD, Barrett SCH, eds. *Ecology and evolution of flowers*. Oxford, UK: Oxford University Press, 311-325.
- Lunau K.** 2004. Adaptive radiation and coevolution - pollination biology case studies. *Organisms, Diversity & Evolution* **4**: 207-224.
- Maad J, Alexandersson R.** 2004. Variable selection in *Platanthera bifolia* (Orchidaceae): phenotypic selection differed between sex functions in a drought year. *Journal of Evolutionary Biology* **17**: 642-650.
- Maad J, Nilsson LA.** 2004. On the mechanism of floral shifts in speciation: gained pollination efficiency from tongue- to eye-attachment of pollinia in *Platanthera* (Orchidaceae). *Biological Journal of the Linnean Society* **83**: 481-495.
- Maad J.** 2000. Phenotypic selection in hawkmoth-pollinated *Platanthera bifolia*: targets and fitness surfaces. *Evolution* **54**: 112-123.
- Müller H.** 1873 Proboscis capable of sucking the nectar of *Angraecum sesquipedale*. *Nature* **8**: 223.
- Nilsson LA.** 1988. Evolution of flowers with deep corolla tubes. *Nature* **334**: 147-149.
- Nilsson LA, Jonsson L, Ralison L, Randrianjohany E.** 1987. Angraecoid orchids and hawkmoths in central Madagascar: specialized pollination systems and generalist foragers. *Biotropica* **19**: 310-318.
- Pauw A, Stofberg J, Waterman RJ.** 2009. Flies and flowers in Darwin's race. *Evolution* **63**: 268–279.
- Rodríguez-Gironés MA, Llandres AL.** 2008 Resource competition triggers the co-evolution of long tongues and deep corolla tubes. *PLoS ONE* **3**: e2992.
- Rodríguez-Gironés MA, Santamaría L.** 2007. Resource competition, character displacement, and the evolution of deep corolla tubes. *American Naturalist* **170**: 455-464.

- Rothschild LW, Jordan K.** 1903. A revision of the Lepidopterous family Sphingidae. *Novitates Zoologicae* **9**: 1-72.
- Stebbins GL.** 1970. Adaptive radiation of reproductive characteristics in angiosperms, I: pollination mechanisms. *Annual Review of Ecology and Systematics* **1**: 307-326.
- Temeles EJ, Kress WJ.** 2003. Adaptation in a plant-hummingbird association. *Science* **300**: 630-633.
- Thompson JN.** 2005. *The geographic mosaic of coevolution*. Chicago, IL, USA: University of Chicago Press.
- van der Niet T, Johnson SD.** 2012. Phylogenetic evidence for pollinator-driven diversification of angiosperms. *Trends in Ecology & Evolution* **27**: 353-361.
- Wallace AR.** 1867. Creation by law. *Quaternary Journal of Science* **4**: 470-488.
- Waser NM, Chittka L, Price MV, Williams NM, Ollerton J.** 1996. Generalization in pollination systems, and why it matters. *Ecology* **77**, 1043-1060.
- Wasserthal LT.** 1997. The pollinators of the Malagasy star orchids *Angraecum sesquipedale*, *A. sororium* and *A. compactum* and the evolution of extremely long spurs by pollinator shift. *Botanica Acta* **110**: 343–359.

CAPÍTULO I

Esfingofilia na Mata Atlântica: relações fenológicas e morfológicas entre
esfingídeos e plantas

*“Passa uma borboleta por diante de mim
E pela primeira vez no Universo eu reparo
Que as borboletas não têm cor nem movimento,
Assim como as flores não têm perfume nem cor.
A cor é que tem cor nas asas da borboleta,
No movimento da borboleta o movimento é que se move,
O perfume é que tem perfume no perfume da flor.
A borboleta é apenas borboleta
E a flor é apenas flor”.*

(Alberto Caeiro)

RESUMO

Mariposas da família Sphingidae estão entre os principais polinizadores em comunidades tropicais. Em áreas de Mata Atlântica, contudo, pouco se conhece sobre a composição de espécies polinizadas por esfingídeos, assim como, suas características fenológicas, morfológicas, e fisiológicas (características do néctar) relacionadas à interação com este grupo de polinizadores. Para testar as hipóteses de ajustamento fenológico e morfológico entre plantas e esfingídeos, este estudo teve como objetivos apresentar a composição de espécies esfingófilas e seu padrão de floração em uma área de Mata Atlântica no sudeste brasileiro, assim como, relacionar os atributos morfológicos das flores, o sistema reprodutivo, as características do néctar e comparar os padrões obtidos com os de outros ecossistemas na região Neotropical. A flora esfingófila compreendeu 24 espécies, das quais apenas quatro são estritamente relacionadas à polinização por esfingídeos. A maioria das espécies produziu néctar com predominância de sacarose e a quantidade de néctar produzido foi diretamente relacionada com o comprimento da flor. Cerca da metade das espécies é autoincompatível, porém praticamente todas são dependentes de polinizadores para reprodução. Esfingídeos e plantas apresentaram correspondência fenológica consistente entre as áreas analisadas na região Neotropical. Estratégia de forrageamento ótimo é o provável fator desencadeador dos ajustamentos fenológicos entre esfingídeos e plantas minimizando a competição por recursos florais entre mariposas com probóscides longas e curtas na fauna de Sphingidae. Foi observado ajustamento morfológico significativo entre os tubos florais e as probóscides. Processos microevolutivos locais, como seleção mediada por polinizadores, provavelmente estão atuando na estruturação da morfologia da flora esfingófila em distintos ecossistemas.

Palavras-chave: Ajustamento fenológico, ajustamento morfológico, especialização, néctar, polinização, sistema reprodutivo, Sphingidae.

INTRODUÇÃO

A conservação e estruturação dos ecossistemas que compõem as comunidades tropicais estão intimamente ligadas aos sistemas de polinização de suas espécies vegetais (Heithaus 1974; Bawa *et al.* 1985, Bawa 1990). As interações entre plantas e seus polinizadores constituem fator integrador das comunidades biológicas, sendo a manutenção dos polinizadores e dos serviços de polinização crítica para o funcionamento e sobrevivência da biocenose como um todo (Vogel & Westerkamp 1991, Buchmann & Nabhan 1996, Kearns *et al.* 1998, Fenster *et al.* 2004).

A polinização por mariposas provavelmente é um dos sistemas mais comuns e menos estudados na região Neotropical (Bawa 1990). As mariposas da família Sphingidae estão entre os principais polinizadores nos trópicos (Bawa 1990, Bawa *et al.* 1985, Harber & Frankie 1989, Darrault & Schlindwein 2002). Plantas esfingófilas possuem um conjunto de características morfológicas e fisiológicas que são importantes para atração de esfingídeos (Baker 1961, Faegri & van der Pijl 1980, Haber & Frankie 1989). Estas espécies geralmente possuem flores tubulares ou em pincel, com cores brancas ou pálidas, abertura crepuscular a noturna, emissão de odores adocicados e produção de néctar com predominância de sacarose (Baker 1961, Proctor & Yeo 1973, Faegri & van der Pijl 1980, Bawa 1990, Haber & Frankie 1989).

Embora em muitos casos haja elevado grau de especialização e dependência dos esfingídeos por parte das espécies esfingófilas (Silberbauer-Gottsberger & Gottsberger 1975, Nilsson 1988), este grupo de mariposas são generalistas e apresentam alta flexibilidade na escolha das flores exploradas (Kislev *et al.* 1972, Nilsson *et al.* 1987). Dessa forma, uma única espécie de esfingídeo pode atuar como polinizadora efetiva de várias espécies vegetais em uma mesma comunidade, ao passo que plantas com longos tubos florais dependem exclusivamente de mariposas com longas probóscides para reprodução sexuada (Kislev *et al.* 1972, Nilsson *et al.* 1987, Harber & Frankie 1989, Darrault & Schlindwein 2002, Martins & Johnson 2007).

As interações planta-polinizador dependem diretamente de suas abundâncias locais, da distribuição espaço-temporal de ambos os grupos, assim como da correspondência dos traços morfológicos envolvidos na interação (Hegland *et al.* 2009, Stang *et al.* 2009, Vázquez *et al.* 2009, Anderson *et al.* 2010). No caso de esfingídeos e plantas, pouco se sabe acerca dos fatores que influenciam a ocorrência de interação entre determinado par de espécies. Entretanto, análises recentes têm sugerido que competição e estratégia de forrageamento ótimo estão entre alguns dos principais fatores que determinam a interação entre esfingídeos e plantas (Rodríguez-Gironés & Santamaría 2006). Competição entre mariposas de probóscides longas e curtas desencadeia a partição na utilização dos recursos florais (Rodríguez-Gironés & Santamaría 2007), na qual mariposas com longas probóscides forrageiam preferencialmente em plantas com longos tubos florais (Agosta & Janzen 2005). Ao nível de comunidade, os aparelhos bucais de esfingídeos e os tubos florais de espécies esfingófilas apresentam correspondência morfológica (*trait matching*) nas distribuições de seus comprimentos (Agosta & Janzen 2005, Amorim 2008). A ocorrência desse padrão em comunidades geograficamente distintas na região Neotropical, Floresta Seca na Costa Rica (Haber & Frankie 1989) e Cerrado no Brasil (Amorim 2008), sugere que pressões seletivas difusas atuam como força motriz na estruturação das morfologias de plantas e polinizadores.

Ao contrário da flora polinizada por beija-flores (Buzato *et al.* 2000) e por morcegos (Sazima *et al.* 1999), polinização por esfingídeos tem sido pobremente estudada em áreas de Mata Atlântica, especialmente no contexto de comunidade. Para grande parte do que resta da Mata Atlântica no Brasil, pouco se sabe acerca da composição de espécies esfingófilas, o padrão fenológico das espécies, os atributos morfológicos de suas flores, as características do néctar, assim como, as relações fenológicas e morfológicas com a fauna de esfingídeos. Conforme Agosta & Janzen (2005) e Amorim (2008), a correspondência morfológica na distribuição dos comprimentos das probóscides dos esfingídeos e dos tubos florais das espécies esfingófilas, parece se tratar de uma tendência geral na região Neotropical. Porém, não é sabido se essa correspondência morfológica, também implica em correspondência

fenológica entre ambos os grupos, ou seja, se a distribuição espacial das morfologias de esfingídeos e plantas é uma função da distribuição temporal.

Estudos sobre a flora esfingófila em áreas de Mata Atlântica, permitem o teste de hipóteses sobre a adaptação entre flores e polinizadores em contexto local, assim como, a comparação de padrões entre ecossistemas distintos na região Neotropical. Neste contexto, este estudo assume a hipótese de correspondência fenológica (baseado na distribuição temporal dos comprimentos de tubos florais e probóscides) bem como, correspondência morfológica na distribuição dos comprimentos dos tubos florais de espécies esfingófilas e probóscides de esfingídeos na Mata Atlântica, ocorrendo tanto em contexto local, quanto regional. Para testar essas hipóteses este trabalho teve como objetivo realizar o levantamento da flora esfingófila em uma área de floresta Montana na Mata Atlântica no sudeste brasileiro, na qual foi descrita: (1) a composição de espécies associadas à polinização por esfingídeos; (2) o padrão de floração destas espécies, (3) os atributos morfológicos de suas flores, (4) o sistema reprodutivo, (5) as características do néctar (volume, concentração, quantidade e composição química dos açúcares), além de (6) analisar as relações fenológicas entre esfingídeos e plantas em distintos ecossistemas na região Neotropical.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

O estudo foi realizado em uma área de Floresta Ombrófila Densa Montana no sudeste do Brasil, situada no Núcleo Santa Virgínia - NSV (23°17' – 23°24' S / 45°03' – 45°11' W), Parque Estadual da Serra do Mar – PESM, entre os anos de 2008 e 2011. A área total do NSV possui cerca de 5.000 ha e está situada entre os municípios de São Luiz do Paraitinga, Cunha e Ubatuba, no estado de São Paulo (Veloso *et al.* 1991). A altitude varia de 850 m a 1.200 m a.n.m. e o clima é tipo Tropical Temperado

(Cwa conforme Köppen 1948), com precipitação média anual superior a 2.000 mm, sendo que mesmo nos meses mais secos (abril a setembro) a precipitação nunca é inferior a 60 mm (Joly *et al.* 2012).

Flora esfingófila e fenologia

A definição das espécies com características associadas à síndrome da esfingofilia seguiu os critérios propostos por Baker (1961), Faegri & van der Pijl (1980) e Haber & Frankie (1989). As espécies foram amostradas a partir de buscas intensivas em cerca de 60 km de transectos, que incluíram trilhas pré-estabelecidas no interior da floresta, estradas rurais nas dependências do NSV, além de um trecho de 15 km da rodovia Oswaldo Cruz que corta a área do NSV. Para isto foi utilizado o método de avistamento, no qual foram incluídas todas as espécies cujas características florais se adequavam às da síndrome da esfingofilia. As espécies que ocupavam o dossel, como epífitas e árvores de grande porte foram localizadas a partir da observação de flores caídas no solo sob a copa das árvores e com auxílio de binóculos.

Após o levantamento e definição das espécies associadas à síndrome da esfingofilia foram realizados acompanhamentos mensais entre julho de 2009 e julho de 2011 para determinar o padrão de floração de cada espécie. A intensidade do evento de floração foi quantificada pela atribuição de notas que designavam um percentual relativo do número de flores produzidas por planta. As notas atribuídas variaram de 0 a 3, com 0 indicando ausência de flores e 1, 2 e 3 a presença nos seguintes intervalos: 1%-25%, 26%-75% e 76%-100%. O número de indivíduos utilizados por espécie variou de um a 30. Esta grande variação no número de indivíduos utilizados foi influenciada pela abundância local de cada espécie. O padrão de floração foi classificado de acordo com Newstrom *et al.* (1994).

Biologia floral e sistema reprodutivo

O horário de abertura e longevidade das flores foi definido acompanhando botões florais previamente marcados desde a abertura até a senescência da flor (Kearns & Inouye 1993, Dafni *et al.*

2005). Também foram coletadas e fixadas em solução de etanol a 70% flores para análises morfológicas mais detalhadas. O néctar acumulado foi extraído para as medidas de volume, com auxílio de microcapilares de vidro e/ou microseringas. A concentração equivalente em açúcares (massa/massa) foi determinada com auxílio de refratômetro manual (Kearns & Inouye 1993). A quantidade de açúcares no néctar foi quantificada e expressada em miligramas seguindo Galetto & Bernardello (2005). Para estas análises foram utilizadas entre cinco e 20 flores por espécie, isoladas durante a fase de pré-antese com sacos de organza de náilon por um período entre 12 e 48 horas de acordo com a longevidade da flor em cada espécie.

Para a análise da composição química do néctar, amostras foram coletadas no campo e armazenadas em papel filtro Whatman nº 1 (Galetto & Bernardello 2005). Estas amostras foram processadas em cromatografia gasosa líquida para determinar o tipo de açúcar no néctar e suas respectivas proporções (Galetto & Bernardello 2005). A proporção sacarose/hexoses foi calculada seguindo Baker & Baker (1983), da seguinte maneira: sacarose/(glicose+frutose), no qual valores menores que 0,1 indicam néctar rico em hexoses (*hexose-rich*: HR); valores intermediários entre 0,1 e 0,499, indicam néctar com predominância de hexoses (*hexose-dominant*: HD); valores entre 0,5 e 0,999, indicam néctar com predominância de sacarose (*sucrose-dominant*: SD); valores iguais ou superiores a 1,0 indicam néctar rico em sacarose (*sucrose-rich*: SR).

Para definição dos principais visitantes florais e polinizadores foram realizadas observações focais tanto durante o dia quanto à noite. As observações no período noturno foram feitas a olho nu, quando em noites claras com lua cheia, ou com auxílio de lanternas com filtro de luz vermelha de forma a minimizar a perturbação aos visitantes (Kearns & Inouye 1993, Dafni *et al.* 2005). Porém, como as visitas de esfíngídeos geralmente são muito raras e fortuitas, para evitar fontes de perturbação externa, mesmo da luz de lanterna com filtro, algumas observações foram realizadas com o auxílio de óculos de visão noturna.

O sistema sexual foi determinado através de análises da morfologia floral ao longo da antese. A receptividade estigmática foi avaliada pelo método de peroxidase, com utilização de solução de H_2O_2 a 20% (Kearns & Inouye, 1993). As flores foram classificadas como hermafroditas, heterostílicas, dicógamas ou dioicas conforme sua morfologia. O sistema reprodutivo foi estudado nas espécies cujas flores estavam acessíveis ou disponíveis em quantidades suficientes para a realização de experimentos de polinização controlada (mínimo de 20 flores por espécie). Para esses experimentos foram realizados os seguintes tratamentos: polinizações cruzadas (flores foram emasculadas e polinizadas com cargas de pólen provenientes de outros indivíduos); autopolinizações manuais (flores foram polinizadas com cargas de pólen provenientes do mesmo indivíduo); autopolinizações espontâneas (flores não manipuladas foram mantidas ensacadas); emasculações (flores em pré-antese foram emasculadas para verificar a formação de frutos por apomixia); e grupos controle (flores foram marcadas, mas não ensacadas e mantidas expostas aos visitantes florais). Adicionalmente, após a realização dos tratamentos, foram coletadas entre cinco e 10 flores para observação do crescimento de tubos polínicos sob microscopia de fluorescência (Martin 1959). O índice de auto-incompatibilidade (ISI *sensu* Bullock 1985) foi determinado em cada espécie, pela razão entre o número de frutos formados por autopolinizações pelos frutos formados por polinizações cruzadas. O limite superior adotado para caracterizar uma espécie como auto-incompatível foi de 0,25 (conforme Oliveira & Gibbs 2000).

Relações morfológicas e fenológicas entre plantas e esfingídeos

Para testar a hipótese de correspondência morfológica (*trait matching*) na distribuição de comprimento dos tubos florais das espécies associadas à síndrome da esfingofilia e das probóscides dos esfingídeos na Mata Atlântica, foi medido o comprimento operativo das flores de cada espécie amostrada no NSV. Este parâmetro foi considerado como a distância entre o nectário e as anteras e estigma. Para cada espécie, foi utilizado um número mínimo de 10 flores, nas quais foram realizadas morfometrias com auxílio de paquímetro digital (erro de 0,01mm). A fauna de Sphingidae foi

amostrada com auxílio de armadilha luminosa no período de março de 2008 a julho de 2009 (Capítulo II). As probóscides de todas as espécies de esfingídeos coletadas (Tabela 1, Capítulo II) foram mensuradas com paquímetro digital (erro 0,01 mm). Adicionalmente, para testar a hipótese de correspondência fenológica entre plantas e polinizadores no contexto regional (correspondência na distribuição temporal dos comprimentos de tubos florais das plantas e dos aparelhos bucais dos polinizadores), foram analisados distintos ecossistemas na região Neotropical, nos quais dados morfológicos e fenológicos de esfingídeos e plantas estavam disponíveis. Ao todo foram analisadas três áreas: Mata Atlântica no NSV (presente estudo), Cerrado no sudeste do Brasil (Amorim 2008) e Floresta Seca na América Central - FSAC (Haber & Frankie 1989).

Análises

Para testar se espécies com maior comprimento de tubo floral produzem mais néctar, foi realizada análise de regressão linear simples entre a quantidade de néctar produzido por espécie (expressada pela média da massa total de açúcares) e a morfologia floral (expressada pelo comprimento médio da flor). Os dados foram log-transformados de forma a obedecer aos pressupostos da análise de regressão.

Os desvios da normalidade na distribuição dos comprimentos das probóscides e dos tubos florais foram analisados pela análise de Shapiro-Wilk (W), para testar a correspondência morfológica entre esfingídeos e plantas na Mata Atlântica. O valor da assimetria da distribuição ($G1$) foi calculado para cada grupo e sua significância foi avaliada pelo teste t de Student para uma amostra (veja detalhes em Agosta & Janzen 2005). Esse procedimento utiliza uma estimativa de erro padrão (EP)= ∞ para testar a hipótese nula de que a assimetria observada não é significativamente diferente do valor esperado, sendo este valor igual a zero para uma distribuição normal (Sokal & Rohlf 1995).

Para os testes de correspondência fenológica, primeiramente foi calculado o comprimento médio dos tubos florais das espécies esfingófilas floridas em cada mês e das probóscides das espécies

de esfingídeos coletados em cada mês dentro de cada uma das três áreas analisadas. A seguir, foi calculada a diferença absoluta (módulo) entre as médias das duas variáveis dentro de cada mês para estimar um parâmetro designado como “ajustamento fenológico”. Para um ajustamento fenológico perfeito, as médias dos comprimentos das probóscides e flores dentro de cada mês deveriam possuir valores iguais, logo a diferença entre os pares de médias, seria igual a zero. Quanto mais discrepante de zero, menor o ajuste fenológico entre as morfologias das plantas e polinizadores. A significância do ajustamento fenológico foi testada utilizando modelos nulos, nos quais foram comparados os valores de ajustamento fenológico observados em cada comunidade, com valores calculados para um conjunto de comunidades geradas por aleatorizações (Manly 2004).

A ocorrência das espécies de esfingídeos dentro de cada mês em cada uma das três comunidades (Mata Atlântica, Cerrado e Floresta seca) foi aleatorizada independentemente. Em cada comunidade gerada por aleatorização, o número de espécies de esfingídeos em cada mês foi mantido igual ao das comunidades observadas. Para isto foram realizadas 1000 aleatorizações de Monte Carlo, para obter as diferenças absolutas entre as médias das probóscides nas comunidades simuladas e nos comprimentos médios das flores em cada mês. O número de simulações com valores iguais ou maiores ao obtido nas comunidades reais foram utilizados para calcular a probabilidade unicaudal (P). Esta é a probabilidade de se encontrar ao acaso, valores de ajustamentos fenológicos menores ou iguais do que os observados nas comunidades reais (Manly 2004). As análises foram realizadas utilizando o software R.2.14.1 (R Development Core Team 2011).

RESULTADOS

Flora esfingófila e fenologia

Foram registradas 24 espécies com características associadas à síndrome da esfingofilia (Tabela 1), as quais pertenciam a 14 gêneros distribuídos em 10 famílias, entre as quais, 21 espécies são nativas e três exóticas: *Lonicera japonica* (Caprifoliaceae), *Hedychium coronarium* (Zingiberaceae) e *Lilium formosanum* (Liliaceae). As famílias mais representativas em número de espécies foram Fabaceae, com sete espécies, Orchidaceae, Rubiaceae e Solanaceae, cada uma com quatro espécies. O hábito variou desde plantas herbáceas com pouco mais de 50 cm de altura até árvores que alcançavam 20 m. Grande parte das espécies ocorreu em densidades muito baixas, tendo sido representadas por no máximo três indivíduos dentro do perímetro amostrado.

Tabela 1. Caracteres morfológicos, atributos florais e sistema reprodutivo da flora esfingófila em Floresta Ombrófila Densa Montana do Núcleo Santa Virgínia, Parque Estadual da Serra do Mar - SP.

Família / Espécie	Hábito	Tubo (mm)	Morfologia	Sistema sexual	Antese	Longevidade	Cor	ISI	Sistema reprodutivo
APOCYNACEAE									
<i>Tabernaemontana</i> sp.	Arbóreo	15,54±1,07	Tubular	Hermafrodita	Crepuscular/Noturna	2 dias	Branca	-	-
CAPRIFOLIACEAE									
<i>Lonicera japonica</i>	Liana	34,20±1,63	Tubular	Hermafrodita	Diurna/Crepuscular	2 dias	Creme	-	-
CHRYSOBALANACEAE									
<i>Couepia rufa</i>	Arbóreo	32,79±2,14	Pincel	Hermafrodita	Diurna	1 dia	Branca	-	-
FABACEAE									
<i>Inga affinis</i>	Arbóreo	11,31±1,23	Pincel	Hermafrodita	Diurna	1 dia	Branca	0,00	Autoincompatível
<i>Inga barbata</i>	Arbóreo	30,65±2,47	Pincel	Hermafrodita	Diurna	1 dia	Branca	-	-
<i>Inga marginata</i>	Arbóreo	10,53±1,34	Pincel	Hermafrodita	Diurna	1 dia	Branca	0,00	Autoincompatível
<i>Inga sessilis</i>	Arbóreo	85,07±3,76	Pincel	Hermafrodita	Diurna	1 dia	Branca	0,05	Autoincompatível
<i>Inga striata</i>	Arbóreo	41,44±4,06	Pincel	Hermafrodita	Diurna	1 dia	Branca	0,00	Autoincompatível
<i>Inga</i> sp.	Arbóreo	57,4±2,63	Pincel	Hermafrodita	Diurna	1 dia	Branca	-	-
LILIACEAE									
<i>Lilium formosanum</i>	Herbáceo	134,55±7,36	Tubular	Protândria*	Crepuscular/Noturna		Branca	-	-
MALVACEAE									
<i>Pseudobombax grandiflorum</i>	Arbóreo	123,66±5,42	Pincel	Hermafrodita	Noturna	2 dias	Branca	-	-
ORQUIDACEAE									
<i>Habenaria fluminensis</i>	Herbáceo	23,25±0,96	Calcarada	Hermafrodita	Crepuscular/Noturna	4 a 6 dias	Esverdeada	1,00	Autocompatível
<i>Habenaria johannensis</i>	Herbáceo	138,24±11,50	Calcarada	Hermafrodita	Crepuscular/Noturna	4 a 6 dias	Esverdeada	0,78	Autocompatível
<i>Habenaria paulistana</i>	Herbáceo	129,31±11,96	Calcarada	Hermafrodita	Crepuscular/Noturna	4 a 6 dias	Esverdeada	0,84	Autocompatível
<i>Habenaria rodeiensis</i>	Herbáceo	36,33±1,11	Calcarada	Hermafrodita	Não há antese	4 a 6 dias	Esverdeada	1,00	Cleistógama
RUBIACEAE									
<i>Amaioua guianensis</i>	Arbóreo	11,53±0,43	Tubular	Dióica	Diurna/Crepuscular	24 horas	Creme		Xenógama
<i>Hillia parasitica</i>	Hemi-epífita	80,72±11,95	Tubular	Hermafrodita	Diurna/Crepuscular	3 a 4 dias	Branca	0,79	Autocompatível
<i>Posoqueria latifolia</i>	Arbóreo	130,16±9,83	Tubular	Hermafrodita	Noturna	2 a 3 dias	Branca	0,95	Autocompatível
<i>Randia armata</i>	Arbóreo	20,97±1,30	Tubular	Protândria*	Noturna	24 horas	Creme	-	-

Tabela 1. Continuação.

Família / Espécie	Hábito	Tubo (mm)	Morfologia	Sistema sexual	Antese	Longevidade	Cor	ISI	Sistema reprodutivo
SOLANACEAE									
<i>Brunfelsia uniflora</i>	Arbustivo	30,51±3,36	Tubular	Hermafrodita	Diurna/Crepuscular	3 a 4 dias	Roxa/Branca	-	-
<i>Brunfelsia hydrangeiformes</i>	Arbustivo	29,53±2,97	Tubular	Hermafrodita	Diurna/Crepuscular	3 a 4 dias	Roxa/Branca	0,2	Autoincompatível
<i>Cestrum amictum</i>	Arbustivo	17,97±0,80	Tubular	Hermafrodita	Noturna	≈ 3 dias	Verde/Branca	0,3	Autocompatível
<i>Cestrum bracteatum</i>	Arbustivo	17,78±0,86	Tubular	Hermafrodita	Noturna	≈ 3 dias	Verde/Branca	0,45	Autocompatível
ZINGIBERACEAE									
<i>Hedychium coronarium</i>	Herbáceo	73,76±22,98	Tubular	Protândria*	Diurna/Crepuscular	2 dias	Branca	0,1	Autoincompatível

- representa espécies para as quais não há dados devido a inacessibilidade ou quantidade insuficiente de flores.

* representa espécies com flores hermafroditas com dicogamia (separação temporal das funções masculina e feminina da flor).

Durante todos os meses do ano foram registradas espécies esfingófilas em floração (Tabela 2). A maior concentração de espécies em floração ocorreu nos meses mais quentes e chuvosos (outubro a março), porém mesmo nos meses mais frios e menos chuvosos havia espécies floridas. As espécies esfingófilas mais especializadas, contudo floresceram exclusivamente no período quente e chuvoso. A maior parte das espécies apresentou comportamento de floração do tipo anual, sendo que a minoria teve floração do tipo subanual ou contínua (*sensu* Newstrom *et al.* 1994) (Tabela 2).

Tabela 2. Fenologia de floração da flora esfingófila em Floresta Ombrófila Densa Montana do Núcleo Santa Virgínia, Parque Estadual da Serra do Mar - SP. A espessura das barras indica a intensidade da floração (1%-25%, 26%-75% e >75%, respectivamente) e a classificação das frequências de classes (tipo de floração) segue Newstrom *et al.* (1994).

Família / Espécie	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Tipo de floração
APOCYNACEAE													
<i>Tabernaemontana</i> sp.													Anual
CAPRIFOLIACEAE													
<i>Lonicera japonica</i>													Subanual
CHRYSOBALANACEAE													
<i>Couepia</i> cf. <i>rufa</i>													Anual
FABACEAE													
<i>Inga</i> cf. <i>affinis</i>													Anual
<i>Inga barbata</i>													Anual
<i>Inga marginata</i>													Contínuo
<i>Inga sessilis</i>													Contínuo
<i>Inga striata</i>													Anual
<i>Inga</i> sp.													Anual
MALVACEAE													
<i>Pseudobombax grandiflorum</i>													Anual
LILIACEAE													
<i>Lilium formosanum</i>													Anual
ORQUIDACEAE													
<i>Habenaria fluminensis</i>													Anual
<i>Habenaria johannesis</i>													Anual
<i>Habenaria paulistana</i>													Anual
<i>Habenaria rodeiensis</i>													Anual
RUBIACEAE													
<i>Amaioua guianensis</i>													Anual
<i>Hillia parasitica</i>													Subanual
<i>Posoqueria latifolia</i>													Subanual
<i>Randia</i> cf. <i>armata</i>													Anual
SOLANACEAE													
<i>Brunfelsia uniflora</i>													Anual
<i>Brunfelsia</i> sp.													Subanual
<i>Cestrum amictum</i>													Subanual
<i>Cestrum bracteatum</i>													Subanual
ZINGIBERACEAE													
<i>Hedychium coronarium</i>													Anual

Biologia floral e sistema reprodutivo

Apenas quatro espécies apresentaram morfologia floral primariamente associada à síndrome da esfingofilia, cuja principal característica é a presença de flores hipocrateriformes ou calcaradas, ambos os tipos caracterizados por tubos florais muito longos (acima de 5,0 cm) e estreitos (Fig. 1A-D). Estas espécies pertencem a duas famílias, Rubiaceae e Orchidaceae, cada uma com duas espécies. De forma geral, as demais espécies apresentaram tubos florais curtos ou flores em pincel (Tabela 1), cuja morfologia permite também a visita de outros grupos de polinizadores (Fig. 1E-F). Muitas destas espécies foram frequentemente visitadas, e mesmo polinizadas, por abelhas, beija-flores (ambos em maior frequência), borboletas, morcegos e mariposas da família Noctuidae. Por outro lado, os registros de visitas por esfingídeos durante a noite, na maioria dos casos, foram muito raros, com exceção em *Inga sessilis* (Fabaceae) e *Posoqueria latifolia* (Rubiaceae).

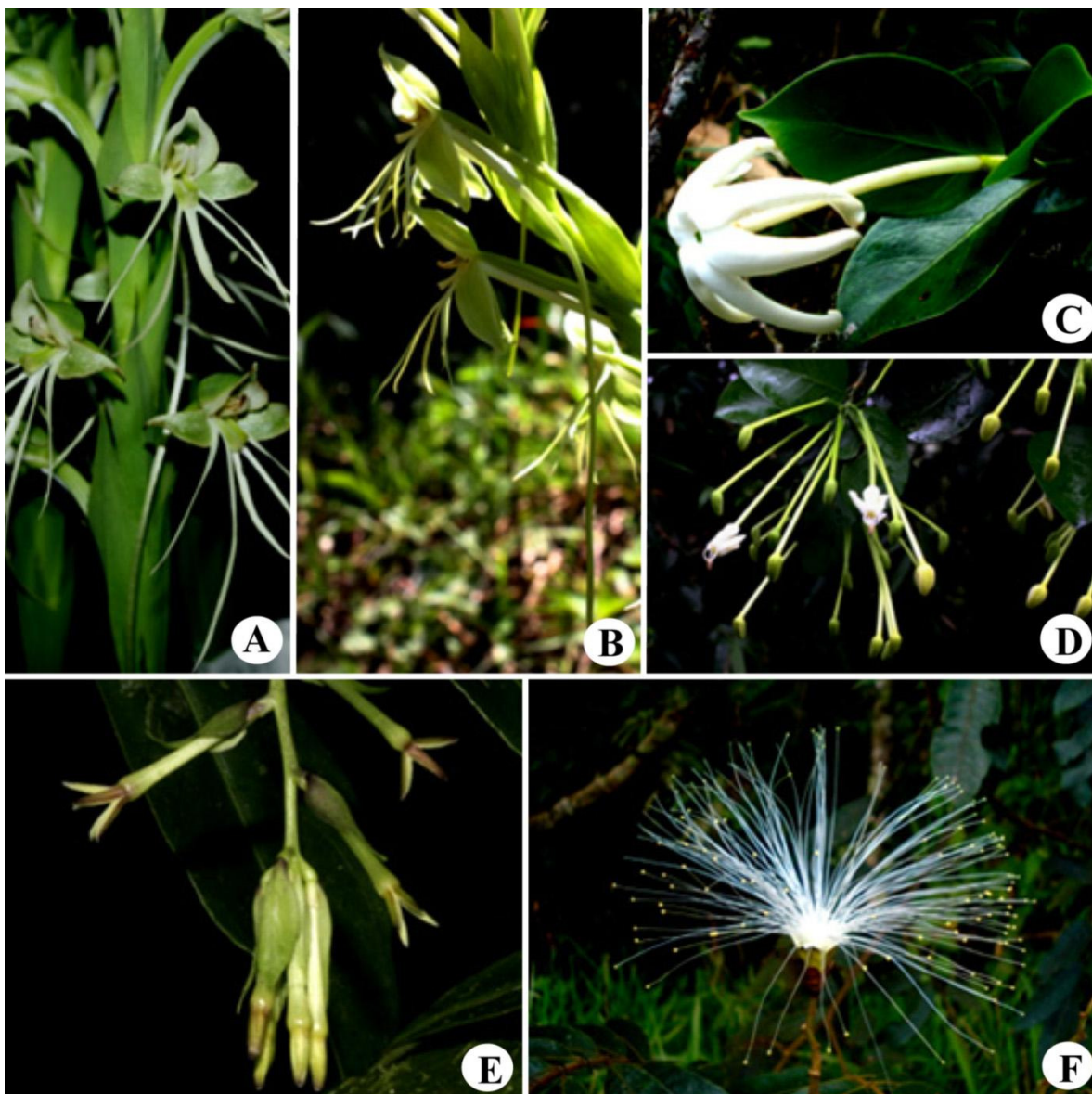


Figura 1. Tipos morfológicos das flores esfingófilas estudadas em Floresta Ombrófila Densa Montana do Núcleo Santa Virgínia, Parque Estadual da Serra do Mar – SP. Flores calcaradas em **A.** *Habenaria johannensis* e **B.** *H. paulistana*. Flores hipocrateriformes com tubo longo em **C.** *Hillia parasitica* e **D.** *Posoqueria latifolia*. Flor hipocrateriforme com tubo curto em **E.** *Cestrum bracteatum*. Flor em pincel em **F.** *Inga sessilis*.

Cerca da metade das espécies estudadas é autocompatível, sendo autoincompatibilidade predominante nas espécies do gênero *Inga* (Tabela 1). O sistema reprodutivo foi verificado em mais de 60% das espécies, das quais, a proporção de espécies autocompatíveis e autoincompatíveis foi de aproximadamente 1:1 (Tabela 1). Destas, apenas *Amaioua guianensis* (Rubiaceae), apresentou sistema sexual do tipo dióico, portanto é xenógama obrigatória. No caso de *Habenaria rodeiensis* (Orchidaceae), apesar da produção conspícua de néctar (Tabela 3), as flores raramente abriam e a fecundação ocorria por autopolinização. As flores fechadas formavam uma câmara na qual as polinárias friáveis liberavam as mássulas que se depositavam sobre a superfície estigmática altamente aderente. Nesta espécie a frutificação foi próxima a 100%, nos cinco indivíduos observados entre os anos de 2008 e 2011.

Com exceção de *Tabernaemontana* sp. (Apocynaceae), as demais espécies produziram néctar. A maioria das espécies nas quais a composição de açúcares no néctar foi analisada (78%) produziu néctar rico em sacarose (Tabela 3). Espécies com flores longas produziram quantidade significativamente maior de néctar, tanto em relação ao volume ($r^2=0,75$; $F_{1,14}=45,73$; $P<0,0001$), quanto em termos de massa de açúcares (Fig. 2; $r^2=0,68$; $F_{1,14}=30,26$; $P=0,0002$).

Tabela 3. Características do néctar da flora esfingófila em Floresta Ombrófila Densa Montana do Núcleo Santa Virgínia, Parque Estadual da Serra do Mar – SP. **S:** sacarose. **F:** frutose. **G:** glicose. **H:** hexoses (frutose+glicose). **SR:** néctar sacarose-rico. **HD:** néctar hexose-dominante. §: representa o valor médio do néctar coletado em três períodos durante a antese da flor. ♂, ♀: representam a fase sexual em que o néctar foi coletado na espécie dicógama ou sexo da flor na espécie dióica.

Família / Espécie	Volume (µL)	Concetração (%)	Açúcar (mg)	Composição química				Tipo
				S	F	G	Razão S/H	
FABACEAE								
<i>Inga marginata</i>	1,87±0,32	16,48±1,38	30,81±0,44	87,64	6,06	6,3	7,09	SR
<i>Inga sessilis</i>	31,67±14,57	18,17±2,71	575,44±39,48	16,83§	49,66§	33,51§	0,20	HD
<i>Inga striata</i>	3,13±0,83	19,63±1,60	61,44±1,33	82,84	9,86	9,86	4,20	SR
LILIACEAE								
<i>Lilium formosanum</i>	♂ 75,33±18,18	13,67±3,21	1029,76±58,36	-	-	-	-	-
	♀ 9,67±10,79	14,00±5,20	135,38±56,11	-	-	-	-	-
ORQUIDACEAE								
<i>Habenaria fluminensis</i>	3,58±2,12	6,73±2,91	24,09±6,17	-	-	-	-	-
<i>Habenaria johannesis</i>	44,51±11,47	14,59±4,30	649,40±49,32	-	-	-	-	-
<i>Habenaria paulistana</i>	19,90±5,37	19,15±2,33	381,09±12,51	-	-	-	-	-
<i>Habenaria rodeiensis</i>	4,67±1,04	4,33±1,50	20,22±1,56	88,99	5,81	5,2	8,08	SR
RUBIACEAE								
<i>Amaioua guianensis</i>	♂ 3,04±0,75	19,86±2,35	60,37±1,76	-	-	-	-	-
	♀ 6,23±1,56	22,53±1,80	140,36±2,81	-	-	-	-	-
<i>Hillia parasitica</i>	31,25±6,86	13,65±2,03	426,56±13,03	64,89	18,9	16,21	1,85	SR
<i>Posoqueria latifolia</i>	28,48±14,20	15,30±1,49	435,74±21,16	-	-	-	-	-
SOLANACEAE								
<i>Brunfelsia uniflora</i>	3,25±3,18	24,50±0,71	79,63±2,26	-	-	-	-	-
<i>Brunfelsia hydrangeiformes</i>	12,65±4,23	18,72±1,48	236,81±6,26	74,54	13,64	11,82	2,93	SR
<i>Cestrum amictum</i>	2,00±1,15	9,29±2,29	18,58±2,63	67,15	16,62	16,23	2,04	SR
<i>Cestrum bracteatum</i>	7,50±0,71	13,33±0,58	99,99±0,41	26,99	36,1	36,9	0,37	HD
ZINGIBERACEAE								
<i>Hedychium coronarium</i>	10,36±5,57	21,21±2,34	219,74±13,03	94,29	3,02	2,69	16,51	SR

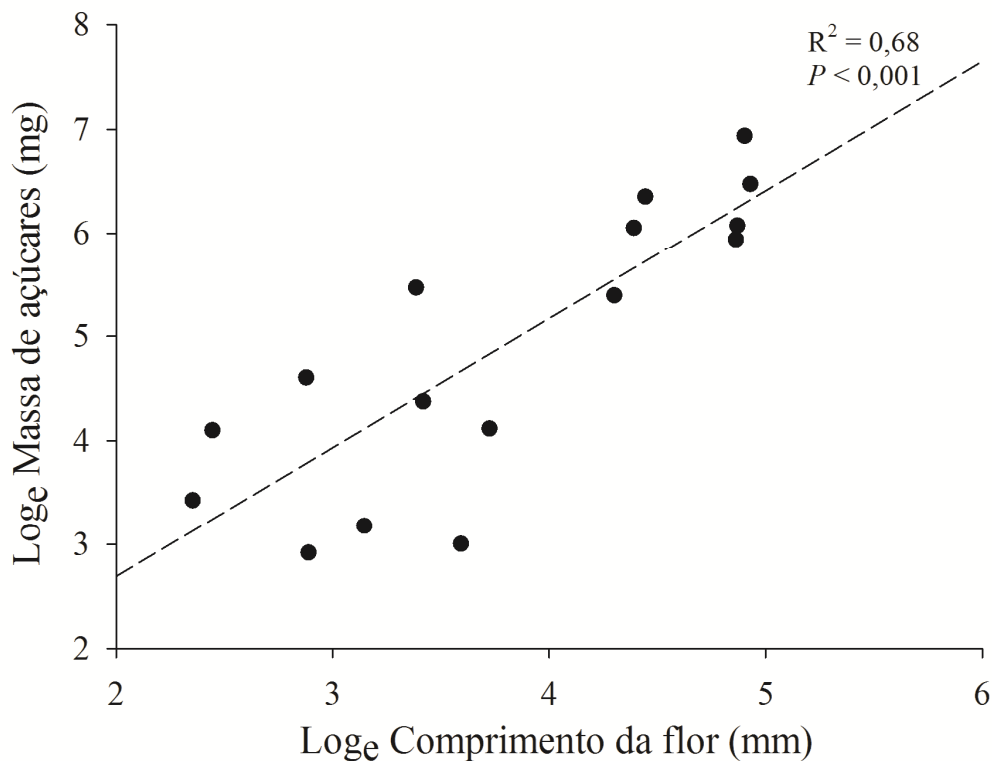


Figura 2. Relação entre o comprimento do tubo floral e a massa de açúcares produzidos por espécie esfingófila em Floresta Ombrófila Densa Montana do Núcleo Santa Virgínia, Parque Estadual da Serra do Mar – SP.

Relações morfológicas e fenológicas entre esfingídeos e plantas

As distribuições dos tubos florais das espécies potencialmente esfingófilas ($n = 24$; $W = 0,815$; $P = 0,0092$; assimetria (GI) = 0,906; EP (GI) = 0,472; $t_s = 5,97$; $P < 0,0001$) e das probóscides da fauna de esfingídeos ($n = 49$; $W = 0,766$; $P < 0,0082$; assimetria (GI) = 2,507; EP (GI) = 0,34; $t_s = 8,79$; $P < 0,0001$) apresentaram padrão com assimetria significativamente desviada à direita (Fig. 3). As medianas dos tubos florais e probóscides foram muito similares praticamente idênticas (Tabela 4) e a distribuição de comprimento de ambos não diferiu estatisticamente entre si ($U = 566$; $Z(U) = 0,393$; $P = 0,695$).

Duas das três comunidades analisadas apresentaram ajustamento fenológico significativo entre plantas e polinizadores: Cerrado, Brasil ($P = 0,004$) e Floresta Seca da América Central ($P = 0,015$) (Fig. 4). O ajustamento observado para a Mata Atlântica no NSV foi apenas marginalmente significativo ($P = 0,066$, Fig. 4).

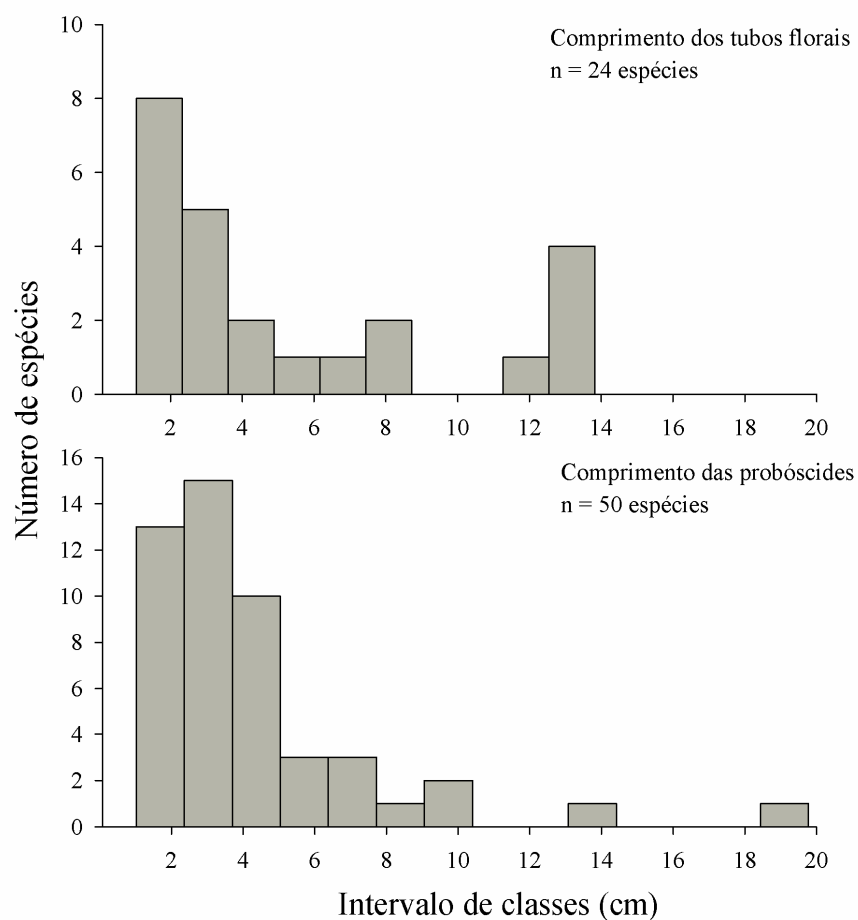


Figura 3. Distribuição dos comprimentos dos tubos florais da flora esfingófila e das probóscides da fauna de Sphingidae em Floresta Ombrófila Densa Montana do Núcleo Santa Virgínia, Parque Estadual da Serra do Mar – SP.

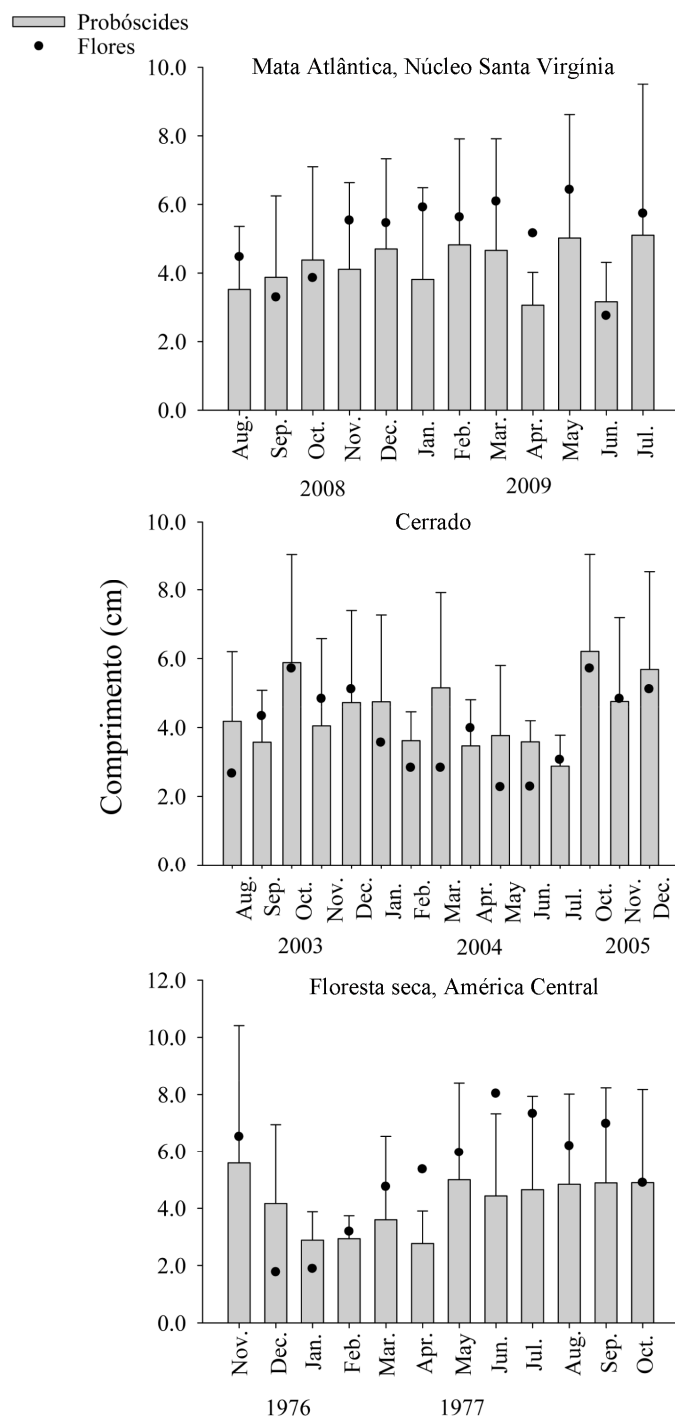


Figura 4. Ajustamento fenológico entre esfingídeos e plantas em três comunidades na região Neotropical. As barras representam o comprimento médio e o desvio padrão das probóscides dos esfingídeos e os círculos representam o comprimento médio dos tubos florais por mês em cada área.

Tabela 4. Estatística descritiva dos valores de comprimento (cm) das probóscides da fauna de Sphingidae e das peças florais da flora esfingófila na Floresta Ombrófila Densa Montana do Núcleo Santa Virgínia, Parque Estadual da Serra do Mar – SP. A distribuição dos valores está plotada na Figura 3.

	Nº de espécies	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo
Comprimento das probóscides	50	4,38	3,44	3,49	1,02	19,78
Comprimento das flores	24	5,49	4,50	3,35	1,05	13,82

DISCUSSÃO

Flora esfingófila e fenologia

A menor riqueza de espécies (24) da flora esfingófila da Floresta Montana no NSV contrasta com a das terras baixas na Mata Atlântica (Floresta Ombrófila Densa de Terras Baixas – FODTB, 30 espécies, Ávila Jr. 2009), a do Cerrado (46 espécies, Amorim 2008) e a da Floresta Seca na América Central (31 espécies, Haber & Frankie 1989). Tendência semelhante ocorre com o número de espécies primariamente adaptadas à esfingofilia do NSV, isto é, com tubos florais acima de 5,0 cm (4 espécies), em relação ao da FODTB (11 espécies, Ávila Jr. 2009) e da FSAC (8 espécies, Haber & Frankie 1989), com exceção do Cerrado (4 espécies, Amorim 2008). As famílias Apocynaceae, Fabaceae, Malvaceae, Rubiaceae e Solanaceae ocorrem nas quatro localidades, sendo os gêneros *Cestrum* (Solanaceae) e *Inga* (Fabaceae) comuns a todas as áreas. O padrão fenológico predominante observado no NSV, contudo, foi muito similar ao de outras floras esfingófilas observadas tanto na em FODTB na Mata Atlântica (Ávila Jr. 2009), quando de outros biomas na região Neotropical (Haber & Frankie 1989, Amorim 2008).

Das espécies esfingófilas amostradas no NSV, 46% (11 espécies) são arbóreas, o que compreende apenas 0,042% do total de espécies arbóreas (265 espécies) registradas no NSV

(Padgurschi *et al.* 2011). Em uma floresta tropical de terras baixas na América central (Bawa *et al.* 1985), o percentual de espécies arbóreas polinizadas por esfingídeos é de 8%, ao passo que em uma área de Cerrado no Brasil central (Oliveira & Gibbs 2000) este valor é de 12%, sendo de 15% em uma área de Cerrado na porção sul no estado de São de Paulo (Siberbauer-Gottsberger & Gottsberger 1988). Apesar de não haver sequer estimativas para o número total de espécies de angiospermas do NSV, considerando todas as espécies independentemente do hábito vegetativo, certamente o percentual de espécies esfingófilas nesta área seria ainda menor que o das espécies arbóreas (0,042%). Em uma área de Cerrado no Triângulo Mineiro na qual toda a flora de angiospermas foi considerada, cerca de 4% das espécies está associada à polinização por esfingídeos (Amorim 2008), o que revela baixa proporção de espécies esfingófilas na Mata Atlântica do NSV em relação a outros habitats na região Neotropical (veja tabela 3 em Oliveira & Gibbs 2000 para comparações entre distintos ecossistemas). Entretanto, apesar da baixa proporção de espécies relacionadas à polinização por mariposas em relação a outros sistemas de polinização em ecossistemas tropicais, este grupo de insetos está relacionado com a reprodução de algumas das principais espécies nestes ecossistemas, como observado no Cerrado (Oliveira *et al.* 2004). Neste sentido, na área do NSV a polinização por esfingídeos, apesar de sua baixa frequência, esteve relacionada com algumas das principais espécies deste ecossistema como: *Inga* spp., que consistem em leguminosas auto-incompatíveis com grande importância na fixação de nitrogênio no solo; *Hillia parasitica* e *Posoqueria latifolia* espécies de Rubiaceae estritamente esfingófilas e amplamente distribuídas na Mata Atlântica; assim como *Habenaria paulistana*, uma Orchidaceae endêmica da Mata Atlântica, com distribuição restrita a uma pequena porção do estado de São Paulo e completamente dependente de esfingídeos para reprodução sexuada (Capítulos III e IV).

O maior número de espécies esfingófilas florescendo durante os meses mais úmidos (outubro a março), coincide com o padrão geral registrado para a Mata Atlântica (Morellato *et al.* 2000). Apesar de ambientes de Mata Atlântica apresentarem baixa sazonalidade climática de maneira geral, áreas de floresta Montana como a do NSV, são marcadas por períodos de temperatura baixas (médias mensais

entre 12° C e 17° C) e precipitação reduzida (médias mensais inferiores a 100 mm, Joly *et al.* 2012 para dados climáticos do NSV) o que reduz a atividade de polinizadores, especialmente de insetos. Adicionalmente, a floração das espécies esfingófilas com tubos florais longos (*Habenaria johannensis*, *H. paulistana*, *Hillia parasitica* e *Posoqueria latifolia*) ocorrendo preponderantemente dentro dos meses mais quentes e úmidos do ano, coincide com o período de maior riqueza e abundância de esfingídeos de longas probóscides (Capítulo II). Como a polinização deste grupo de espécies mais especializadas é diretamente dependente das mariposas com longas probóscides (Capítulo III), é provável que o padrão fenológico da flora esfingófila do NSV seja resultante da conjunção de fatores tanto bióticos quanto abióticos.

Biologia floral e sistema reprodutivo

Apesar das características associadas à síndrome da esfingofilia (Baker 1961, Faegri & van der Pijl 1980, Haber & Frankie 1989), a morfologia floral da maioria das espécies do NSV (75%), não restringe o acesso às flores apenas a esfingídeos. Sistemas de polinização generalistas, de fato são amplamente distribuídos e mais comuns que sistemas estritamente especializados (Waser *et al.* 1996, Freitas & Sazima 2006, Ollerton *et al.* 2009). Para grande parte das angiospermas, apenas a análise da morfologia floral não permite a identificação do espectro de polinizadores e visitantes florais (Ollerton *et al.* 2009). Algumas espécies deste estudo (e.g. *Inga sessilis*) foram efetivamente polinizadas por outros grupos, como beija-flores e morcegos (Capítulo V). Por outro lado, análises da carga polínica da fauna de Sphingidae coletada no NSV revelaram que estas mariposas possuem hábito alimentar altamente generalista (F.W. Amorim, A.M.S. Corrêa, M.A.V. Cruz-Barros & M. Sazima, dados não publicados), como resultado das visitas a amplo espectro de plantas não associadas à síndrome da esfingofilia (e.g. *Andira* sp., *Guazuma* sp., *Jacaranda* sp., *Machaerium* sp., *Mucuna* sp., *Pterocarpus* sp., *Rhipsalis* sp., *Tabebuia* sp., *Tibouchina* sp., *Vernonia* sp.).

As adaptações aos polinizadores, contudo, não estão relacionadas apenas às características morfológicas da flor, mas também a outros atributos como a composição química dos açúcares produzidos no néctar e sua dinâmica de produção (Baker & Baker 1983, Galetto & Bernardello 2005, Capítulo V para discussões sobre uma das espécies deste estudo). A predominância de sacarose nas espécies da flora esfingófila do NSV (Tabela 3), corresponde a de espécies polinizadas por esfingídeos, bem como a de beija-flores (Baker & Baker 1983, Koptur 1994). Em outra área de Mata Atlântica (Ávila Jr. 2009), sacarose como tipo de açúcar predominante em espécies polinizadas por esfingídeos foi registrada em espécies menos especializadas (tubos florais curtos, < 3,0 cm) e em algumas espécies estritamente esfingófilas (tubos florais longos, > 10,0 cm). De modo geral, nas espécies estudadas a proporção dos tipos de açúcares se mantém ao longo da antese floral. Este aspecto difere em *Inga sessilis* na qual a ocorrência de modificações do tipo de açúcar predominante no néctar ao longo da antese permite atender às preferências de diferentes grupos de polinizadores (Capítulo V). Adaptações a diferentes tipos de polinizadores são comuns em espécies de *Inga* (Koptur 1994, Haber & Frankie 1989).

O volume do néctar variando entre e 1,0-80,0 μ L, a concentração e massa de açúcares variando entre 4,0-24,0% e 18,0-1050,0 mg açúcares/flor, respectivamente, é similar ao padrão da flora esfingófila da FSAC (Haber & Frankie 1989), o que sugere que as características do néctar das espécies do NSV se adequam às necessidades da fauna de esfingídeos. Flores com tubos florais longos, apesar de oferecerem quantidades significativamente maiores de néctar (Fig. 2), restringem o acesso ao recurso floral apenas às mariposas com probóscides suficientemente longas para alcançá-lo. Por sua vez, mariposas com longas probóscides (acima de 5,0 cm) são menos abundantes na área, compreendendo apenas 17% de todos os indivíduos coletados no NSV e 24% do total de espécies amostradas (Capítulo II). Este percentual de mariposas com probóscides longas é equivalente ao de plantas nativas do NSV (cerca de 20%) com tubos florais longos.

De modo geral, o número de espécies autoincompatíveis associadas à polinização por esfingídeos no NSV (independentemente do grupo de polinizador) é similar ao de comunidades tropicais (tabela 5, Oliveira & Gibbs 2000). Mesmo as espécies autocompatíveis do NSV, nas quais a biologia da polinização foi estudada em maior detalhe, apresentaram completa dependência de visitantes florais para polinização. Neste sentido, a flora esfingófila do NSV é altamente dependente de polinizadores para reprodução sexuada. Entretanto, apesar da aparente elevada abundância de esfingídeos registrada na área, as visitas das mariposas foram raras para a maioria das espécies limitando o sucesso reprodutivo. Limitação de polinizadores é muito comum em espécies esfingófilas (Herrera 1990, Moody-Weis & Heywood 2001, Oliveira *et al.* 2004). Particularmente espécies com longos tubos florais, as quais são dependentes do grupo menos abundante de esfingídeos para sua polinização, podem ter a reprodução altamente afetada pela limitação de polinizadores (Huang & Fenster 2007, Zhang *et al.* 2011, Capítulo III).

Relações morfológicas e fenológicas entre esfingídeos e plantas

Como registrado para as comunidades de FSAC (Agosta & Janzen 2005) e Cerrado (Amorim 2008), as distribuições dos comprimentos dos tubos florais e probóscides no NSV apresentaram correspondência morfológica ao nível de comunidade (Fig. 3). Esse ajustamento morfológico entre esfingídeos e plantas em distintas áreas na região Neotropical corrobora a hipótese de que este padrão seria evidente em amplo contexto espacial e evolutivo (Agosta & Janzen 2005). Adaptações entre plantas e polinizadores promovem estreita correspondência dos traços morfológicos de ambos os grupos (Altshuler & Clark 2003, Temeles & Kress 2003). Muitos estudos têm demonstrado a ocorrência de covariações entre os traços morfológicos de plantas e polinizadores através de sua área de distribuição (Stebbins 1970, Miller 1981, Johnson 1997, Anderson & Johnson 2008, Brunet 2008, Gómez *et al.* 2008, Pauw *et al.* 2009, Pérez-Barrales *et al.* 2009, Schlumpberger *et al.* 2009).

Apesar das semelhanças de alguns elementos da flora esfingófila da FSAC, do Cerrado e do NSV, estas áreas possuem composições florísticas muito distintas umas das outras. Por outro lado, a fauna de Sphingidae em áreas de Mata Atlântica, Cerrado e FSAC possui elevada similaridade na composição de espécies (Amorim *et al.* 2009). Desta forma, como ocorre elevada similaridade na fauna dos polinizadores e elevada dissimilaridade na composição de plantas, é provável que a correspondência morfológica entre plantas e esfingídeos comum a Mata Atlântica, Cerrado e FSAC seja resultante de processos microevolutivos locais dirigidos pelos polinizadores. De fato, polinizadores possuem papel fundamental na evolução da morfologia floral (Stebbins 1970, Temeles & Kress 2003, Kay *et al.* 2006, Johnson 2006). Processos de seleção mediada por polinizadores acarretam a diferenciação da morfologia floral tornando as populações de plantas localmente adaptadas à fauna de polinizadores (Maad 2000, Alexandersson & Johnson 2002, Herrera *et al.* 2006, Benitez-Vieyra *et al.* 2006, Anderson & Johnson 2008, Pauw *et al.* 2009, Pérez-Barrales *et al.* 2009). Neste sentido, as interações entre esfingídeos e plantas esfingófilas dentro de um contexto de comunidade, possivelmente dirigiram os padrões locais de ajustamento morfológico encontrados nas três áreas consistentemente com a hipótese proposta por Agosta & Janzen (2005).

A despeito da marcada correspondência morfológica entre os comprimentos dos tubos florais e probóscides nas três localidades consideradas, nossas análises revelaram correspondências significativas na distribuição temporal destes atributos apenas para os ecossistemas de Cerrado e FSAC (Fig. 4). Entretanto, para a comunidade de Mata Atlântica observada no NSV o grau de não-correspondência (“*mismatch*”) temporal não foi suficientemente elevado, para que houvesse completo desajuste entre as fenologias de esfingídeos e das plantas nesta área. Por outro lado, as análises polínicas da fauna de Sphingidae do NSV (F.W. Amorim, A.M.S. Corrêa, M.A.V. Cruz-Barros & M. Sazima dados não publicados), revelaram que estas mariposas além de possuírem hábito alimentar generalista, também se deslocam entre distintas fisionomias da Mata Atlântica forrageando em plantas esfingófilas que não ocorrem na Floresta Ombrófila Densa Montana do NSV, pois algumas espécies de

mariposas com longas probóscides capturadas no NSV como, *Agrius cingulata*, *Manduca brasiliensis* e *M. rustica* carregavam cargas de pólen de *Tocoyena bullata* (Rubiaceae), uma espécie de ocorrência exclusiva da vegetação de Restinga em área de terras baixas na Mata Atlântica. Isto indica que esfingídeos transitam entre a Floresta Ombrófila Densa de Terras Baixas e a Floresta Ombrófila Densa Montana visitando, provavelmente, amplo espectro de plantas nestas áreas, que estão separadas entre si por cerca de 15 km em um gradiente altitudinal de 1 km. Logo, o ajustamento temporal parcial encontrado no NSV deve corresponder apenas a uma fração das interações entre esfingídeos e plantas na região.

A não-correspondência temporal entre esfingídeos e plantas no NSV tem, inclusive, implicações sobre os processos locais de seleção mediada por polinizadores em algumas espécies esfingófilas desta área (Capítulo IV). *Habenaria johannensis* e *H. paulistana* apresentam tubos florais (esporões) com comprimento médio superior ao comprimento médio das probóscides da fauna de esfingídeos. Como a polinização destas orquídeas é altamente dependente de um acoplamento mecânico da flor com o polinizador (Capítulo III), a não-correspondência entre os traços morfológicos de ambos os grupos limita a ocorrência de seleção mediada pelos polinizadores sobre o comprimento dos esporões (Capítulo IV).

A correspondência fenológica entre esfingídeos do Cerrado e da FSAC sugere que há coincidência temporal na floração das espécies esfingófilas com tubos florais longos, com a ocorrência das espécies de esfingídeos com probóscides longas (Fig. 3). Diferentemente da Mata Atlântica, ambos os ambientes apresentam uma sazonalidade climática altamente acentuada, assim como, uma sazonalidade muito marcada na fauna de Sphingidae (Haber & Frankie 1989, Amorim et al., 2009) No NSV, a despeito da baixa sazonalidade climática e da ausência de correspondência fenológica estrita entre plantas e polinizadores, de maneira geral, a floração das plantas com longos tubos florais esteve concentrada dentro do período mais úmido do ano, coincidindo com a ocorrência dos esfingídeos de probóscides longas na área (ver discussão no Capítulo II). Esse padrão de ajustamento fenológico entre

plantas e polinizadores em distintos ecossistemas na região Neotropical ocorre a despeito da ausência de restrições morfológicas que esfingídeos com longas probóscides possuem para o acesso ao néctar nas espécies esfingófilas floridas ao longo do ano em cada uma das áreas.

Entretanto, se mariposas com longas probóscides são capazes de acessar o néctar em plantas floridas ao longo de todo o ano, por que sua fenologia é ajustada à fenologia de floração das plantas esfingófilas mais especializadas? Seguindo modelos de forrageamento ótimo, competição leva a partição de recursos entre membros de probóscides longas e curtas em comunidade de polinizadores que competem por recursos florais (Rodríguez-Gironés & Santamaría 2006, 2007). Mariposas com longas probóscides, por sua vez, compõem apenas uma pequena fração da fauna de Sphingidae na região Neotropical (Capítulo II, Schreiber 1978, Haber & Frankie 1989, Amorim *et al.* 2009). Estas mariposas possuem maior massa corpórea (figura 3 em Agosta & Janzen 2005), assim como, maiores necessidades energéticas e custos para o forrageamento (Heinrich 1983). Desta forma, devido a maior riqueza de espécies e abundância de indivíduos com probóscides curtas, a competição por néctar é muito superior quando mariposas de probóscides longas forrageiam em espécies com tubos florais curtos. A quantidade de néctar produzida por espécie em termos tanto volumétricos, quanto calóricos, está diretamente relacionada ao comprimento do tubo floral (Fig. 2, figura 6 em Haber & Frankie 1989). Além disto, flores com tubos florais longos restringem o acesso ao néctar apenas ao grupo de mariposas menos abundantes, desta maneira, essas flores provêem um nicho privado às mariposas com longas probóscides. Neste sentido, dentro de um contexto de forrageamento ótimo no qual polinizadores competem por recursos florais (Rodríguez-Gironés & Santamaría 2006, 2007), o ajustamento fenológico entre mariposas com longas probóscides e o período de floração das espécies de tubos florais longos seria uma estratégia eficaz para minimizar a competição entre membros de probóscides longas e curtas da fauna de Sphingidae na região Neotropical.

REFERÊNCIAS

- Agosta SJ, Janzen DH. 2005.** Body size distributions of large Costa Rican dry forest moths and the underlying relationship between plant and pollinator morphology. *Oikos* **108**: 183–193.
- Alexandersson R, Johnson SD. 2002** Pollinator-mediated selection on floral tube length in a hawkmoth-pollinated *Gladiolus* (Iridaceae). *Proceedings of the Royal Society Series B: Biological Sciences* **269**: 631-636.
- Altshuler DL, Clark CJ. 2003.** Darwin's Hummingbirds. *Science* **300**: 588–589.
- Amorim, FW. 2008.** *A comunidade de esfingídeos (Lepidoptera, Sphingidae) e plantas esfingófilas numa área de Cerrado no sudeste do Brasil: biogeografia e associações mutualísticas.* Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG.
- Amorim FW, Avila Jr. RS, Camargo JA, Vieira A, Oliveira PE. 2009.** A hawkmoth crossroads? Species richness, seasonality and biogeographical affinities of Sphingidae in a Brazilian Cerrado. *Journal of Biogeography* **36**: 662–674.
- Anderson B, Johnson SD. 2008.** The geographical mosaic of coevolution in a plant-pollinator mutualism. *Evolution* **62**: 220–225.
- Anderson B, Terblanche JS, Ellis AG. 2010.** Predictable patterns of trait mismatches between interacting plants and insects. *BMC Evolutionary Biology* **10**: 204.
- Ávila Jr. RS. 2009.** *A guilda de plantas esfingófilas e a comunidade de Sphingidae em uma área de Floresta Atlântica do Sudeste do Brasil.* Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.
- Baker HG, Baker I. 1983.** Floral nectar sugars constituents in relation to pollinator type. In: Jones C.E., Little R.J. (Eds.), *Handbook of experimental pollination biology*. New York: Van Nostrand Reinhold Co., EUA: 117–141.

- Baker HG.** 1961. The adaptation of flowering plants to nocturnal and crepuscular pollinators. *Quarterly Review of Biology* **36**: 64-73.
- Bawa KS.** 1990. Plant-pollinator interactions in Tropical Rain Forests. *American Journal of Botany* **72**: 346- 456.
- Bawa KS, Bullock SH, Perry DR, Coville RE, Grayum MH.** 1985. Reproductive biology of tropical lowland rain forest II. Pollination systems. *American Journal of Botany* **72**: 346-356.
- Benitez-Vieyra S, Medina AM, Glinos E, Cocucci AA.** 2006. Pollinator-mediated selection on floral traits and size of floral display in *Cyclopogon elatus*, a sweat bee-pollinated orchid. *Functional Ecology* **20**: 948-957.
- Brunet, J. & Sweet, H.** 2006. Impact of insect pollinator group and floral display size on outcrossing rate. *Evolution* **60**: 234-246.
- Buchmann SL, Nabhan, GP.** 1996. *The Forgotten Pollinators*. Island Press, Washington, D. C.
- Buzato S, Sazima M, Sazima I.** 2000. Hummingbird-pollinated floras at three Atlantic Forest sites. *Biotropica* **32**: 824-841.
- Dafni A, Kevan PG, Husband BC.** 2005. *Practical Pollination Biology*. Cambridge,
- Darrault RO, Schlindwein C.** 2002. Esfingídeos (Lepidoptera, Sphingidae) no Tabuleiro Paraibano, nordeste do Brasil: abundância, riqueza e relação com plantas esfingófilas. *Revista Brasileira de Zoologia* **19**: 429-443.
- Faegri K, van der Pijl L.** 1980. *The principles of pollination ecology*. Pergamon Press, New York, NY, EUA.
- Fenster CB, Armbruster WS, Wilson P, Dudash MR, Thomson JD.** 2004. Pollination syndromes and floral specialization. *Annual Review in Ecology, Evolution and Systematics*, **35**: 375-403.
- Freitas L, Sazima M.** 2006 Pollination biology in a tropical high-altitude grassland in Brazil: interactions at the community level. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **93**: 465-516.

- Galetto L, Bernardello G. 2005.** Nectar. In: Dafni A, Kevan P, eds. *Pollination ecology: a practical approach*. Cambridge, Canada, 156-212.
- Gómez JM, Bosch J, Perfectti F, Fernández JD, Abdelaziz M, Camacho JPM. 2008.** Spatial variation in selection on corolla shape in a generalist plant is promoted by the preference patterns of its local pollinators. *Proceedings of the Royal Society B* **275**: 2241-2249.
- Haber WA, Frankie GW. 1989.** A tropical hawkmoth community: Costa Rican dry forest Sphingidae *Biotropica* **21**: 155–172.
- Hegland SJ, Nielsen A, Lázaro A, Bjerknes AL, Totland Ø. 2009.** How does climate warming affect plant-pollinator interactions? *Ecology Letters* **12**: 184-195.
- Heinrich B. 1983.** Insect foraging energetics. *Handbook of experimental pollination biology*. In: Jones CE, Little RJ, eds. Van Nostrand, New York, USA, 187-214.
- Heithaus ER. 1974.** The Role of Plant-Pollinator Interactions in Determining Community Structure. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **61**:675-691.
- Herrera, CM. 1990.** The adaptedness of the floral phenotype in a relict endemic, hawkmoth-pollinated violet. 1. Patterns of variation among disjunct populations. *Biological Journal of the Linnean Society* **40**: 275-291.
- Herrera CM, Castellanos MC, Medrano M. 2006.** Geographical context of floral evolution: towards an improved research programme in floral diversification. In: Harder LD, Barrett SCH, eds. *Ecology and evolution of flowers*. Oxford University Press, 278-294.
- Huang S-Q, Fenster CB. 2007.** Absence of long-tongued pollinators for long corolla-tube Himalayan *Pedicularis* species: implications for the evolution of corolla length. *International Journal of Plant Sciences* **168**, 325–331.
- Johnson SD. 1997.** Pollination ecotypes of *Satyrium hallackii* (Orchidaceae) in South Africa. *Botanical Journal of the Linnean Society* **123**: 225-235.

- Johnson SD.** 2006. Pollinator-driven speciation in plants. In: Harder LD, Barrett SCH, eds. *Ecology and evolution of flowers*. Oxford university press, 295-310
- Joly CA, Assis MA, Bernacci LC, Tamashiro JY, Campos MCR, Gomes JAMA, et al.** 2012. Floristic and phytosociology in permanent plots of the Atlantic Rainforest along an altitudinal gradient in southeastern Brazil. *Biota Neotropica* **12**: 123-145.
<http://www.biotaneotropica.org.br/v12n1/pt/fullpaper?bn01812012012+pt>
- Kay KM, Voelckel C, Yang JY, Hufford KM, Kaska DD, Hodges SA.** 2006. Floral characters and species diversification. In: Harder LD, Barrett SCH, eds. *Ecology and evolution of flowers*. Oxford University Press, 311-325.
- Kearns CA, Inouye DW.** 1993. *Techniques for pollination biologists*. University Press of Colorado, Niwot, Colorado.
- Kearns CA, Inouye DW, Waser NM.** 1998. Endangered mutualisms: The conservation of plant-pollinator interactions. *Annual Review of Ecology and Systematic* **29**: 83-112.
- Kislev ME, Kravitz Z, Lorch J.** 1972. A study of hawkmoth pollination by a palinological analysis of the proboscis. *Israel Journal of Botany* **21**: 57-75.
- Köppen W.** 1948. *Climatologia: con un estudio de los climas de la tierra*. Fondo de Cultura Económica, México.
- Koptur S.** 1994 Floral and extrafloral nectars of Costa Rican *Inga* trees: a comparison of their constituents and composition. *Biotropica* **26**: 276-284.
- Maad J.** 2000. Phenotypic selection in hawkmoth-pollinated *Platanthera bifolia*: targets and fitness surfaces. *Evolution* **54**: 112-123.
- Manly BFJ.** 2004. *Randomization, bootstrap and Monte Carlo methods in biology*. 3rd. edition Chapman & Hall/CRC, Boca Raton, FL.
- Martin, FW.** 1959. Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. *Stain Technology* **34**: 125-128.

- Martins DJ, Johnson SD. 2007.** Hawkmoth pollination of aerangoid orchids in Kenya, with special reference to nectar sugar concentration gradients in the floral spurs. *American Journal of Botany* **94**: 650-659.
- Miller RB. 1981.** Hawkmoths and the Geographic Patterns of Floral Variation in *Aquilegia caerulea*. *Evolution* **35**: 763-774.
- Moody-Weis JM, Heywood JS. 2001.** Pollination limitation to reproductive success in the Missouri evening primrose, *Oenothera macrocarpa* (Onagraceae). *American Journal of Botany* **88**: 1615-1622.
- Morellato LPC, Talora DC, Takahashi A, Bencke CC, Romera EC, Zipparro VB. 2000.** Phenology of Atlantic Rain Forest trees: a comparative study. *Biotropica* **32**: 811-823.
- Newstrom LE, Frankie GW, Baker HG. 1994.** A new classification for plant phenology based on flowering patterns in Lowland Tropical Rain Forest Trees at La Selva, Costa Rica. *Biotropica* **26**: 141-159.
- Nilsson LA. 1983.** Processes of isolation and introgressive interplay between *Platanthera bifolia* (L.) Rich and *P. chlorantha* (Custer) Reichb. (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **87**: 325-350.
- Nilsson LA, Jonsson L, Ralison L, Randrianjohany E. 1987.** Angraecoid orchids and hawkmoths in central Madagascar: specialized pollination systems and generalist foragers. *Biotropica* **19**: 310-318.
- Oliveira PE, Gibbs PE. 2000.** Reproductive biology of wood plants in a Cerrado community of central Brazil. *Flora* **195**: 311-329.
- Oliveira PE, Gibbs PE, Barbosa AA. 2004.** Moth pollination of woody species in the Cerrados of Central Brazil: a case of so much owed to so few? *Plant Systematics and Evolution* **245**: 41-54.

- Ollerton J, Alarcón R, Waser NW, Price MA, Watts S, Cranmer L, Hingston A, Peter CI, Rotenberry J.** 2009 A global test of the pollination syndrome hypothesis. *Annals of Botany* **103**: 1471-1480.
- Padgurschi MCG, Pereira LP, Tamashiro JY, Joly CA.** 2011. Composição e similaridade florística entre duas áreas de Floresta Atlântica Montana, São Paulo, Brasil. *Biota Neotropica*. **11**: <http://www.biotaneotropica.org.br/v11n2/pt/abstract?article+bn02811022011>
- Pauw A, Stofberg J, Waterman RJ.** 2009. Flies and flowers in Darwin's race. *Evolution* **63**: 268-279.
- Pérez-Barrales R, Pino R, Albaladejo RG, Arroyo J.** 2009. Geographic variation of flower traits in *Narcissus papyraceus* (Amaryllidaceae): do pollinators matter? *Journal of Biogeography* **35**: 1411-1422.
- Proctor M, Yeo P, Lack A.** 1996. *The natural history of pollination*. London: Harper Collins Publishers, UK.
- R Development Core Team.** 2012. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available: <http://www.R-project.org/> via the Internet. *Accessed on 20 Jun 2012*.
- Rodríguez-Gironés MA, Santamaría L.** 2006. Models of optimal foraging and resource partitioning: deep corollas for long tongues. *Behavioral Ecology* **17**: 905-910.
- Rodríguez-Gironés MA, Santamaría L.** 2007. Resource competition, character displacement, and the evolution of deep corolla tubes. *American Naturalist* **170**: 455-464.
- Sazima M, Buzato S, Sazima I.** 1999. Bat-pollinated flower assemblages and bat visitors at two Atlantic Forest sites in Brazil. *Annals of Botany* **83**: 705-712.
- Schlumpberger BO, Cocucci AA, Moré M, Sérsic AN & Raguso RA.** 2009. Extreme variation in floral characters and its consequences for pollinator attraction among populations of an Andean cactus. *Annals of Botany* **103**: 1489-1500.

- Schreiber H.** 1978. Dispersal centers of Sphingidae (Lepidoptera) in the Neotropical region. *Biogeografica* **10**: 1-195.
- Silberbauer-Gottsberger I, Gottsberger G.** 1975. Über sphingophile Angiospermen brasiliens. *Plant Systematic and Evolution* **123**: 157-184.
- Silberbauer-Gottsberger I, Gottsberger G.** 1988. A polinização de plantas do cerrado. *Revista Brasileira de Biologia* **48**: 651-663.
- Sokal RR, Rohlf FJ.** 1995. *Biometry*. New York, W. H. Freeman and Company.
- Stang M, Klinkhamer PGL, Waser NM, Stang I, van der Meijden E.** 2009. Size-specific interaction patterns and size matching in a plant–pollinator interaction web. *Annals of Botany* **103**: 1459-1469.
- Stebbins GL.** 1970. Adaptive radiation of reproductive characteristics in angiosperms, I: pollination mechanisms. *Annual Review of Ecology and Systematics* **1**: 307-326.
- Temeles EJ, Kress WJ.** 2003. Adaptation in a plant-hummingbird association. *Science* **300**: 630-633.
- Vazquez DP, Bluthgen N, Cagnolo L, Chacoff NP.** 2009. Uniting pattern and process in plant-animal mutualistic networks: a review. *Annals of Botany* **103**: 1445-1457.
- Veloso HP, Rangel-Filho ALR, Lima JCA.** 1991. *Classificação da Vegetação Brasileira, Adaptada a um Sistema Universal*. IBGE, Departamento de Recursos Naturais e Estudos Ambientais.
- Vogel S, Westerkamp C.** 1991. Pollination: an integrating factor of biocenoses, In Seitz A, Loeschke V, eds. *Species conservation: a population-biological approach*, Boston, Birkhäuser, 159-170.
- Waser NM, Chittka L, Price MV, Williams NM, Ollerton J.** 1996. Generalization in pollination systems, and why it matters. *Ecology* **77**, 1043-1060.
- Zhang Z-Q, Kress WJ, Xie W-J, Ren P-Y, Gao J-Y, Li Q-J.** 2011. Reproductive biology of two Himalayan alpine gingers (*Roscoeia* spp., Zingiberaceae) in China: pollination syndrome and compensatory floral mechanisms. *Plant Biology* **13**: 582-589.

CAPÍTULO II

Diversidade e composição faunística de Sphingidae na Mata Atlântica §

"Boa noite, lâmpida!
- Boa noite, mariposa!
Permita-me oscular na sua face?
- Pois não! Mas rápido ehin, que daqui a pouco eles me apagam!"

"As mariposa, quando chega o frio
Fica dando vorta em vorta da lâmpida pra si isquentá
Elas roda, roda, roda e dispois se senta
Em cima do prato da lâmpida pra descansá"

(As Mariposa, Adoniran Barbosa)

§ Manuscrito em preparação para ser submetido ao periódico *Biodiversity and Conservation*.

RESUMO

A Mata Atlântica é um dos biomas brasileiros mais diversos e ameaçados e compreende um dos *hotspots* de biodiversidade prioritários para conservação no planeta. Apesar do que se conhece para flora e para fauna de vertebrados deste bioma, pouco se sabe acerca da diversidade e composição faunística da maioria dos grupos de invertebrados. Neste contexto, este estudo teve como objetivos descrever a diversidade de Sphingidae em uma área de Floresta Ombrófila Densa (FOD) Montana no sudeste do Brasil, realizar a comparação faunística com uma área de FOD de Terras Baixas, analisar as relações faunísticas de Sphingidae, além de descrever a composição faunística e estimar a riqueza total de esfingídeos para toda Mata Atlântica. No total foram registradas 50 espécies de esfingídeos para a FOD Montana e 116 espécies para a Mata Atlântica. A riqueza total de espécies esperada para o sítio amostral é de 60 a 70 espécies e para o bioma entre 150 e 170 espécies. A fauna de espécies na Mata Atlântica foi constituída predominantemente por mariposas de probóscides curtas, tanto em número de espécies, quanto em termo de abundância de indivíduos. A fauna da FOD Montana teve distribuição sazonal, especialmente pelo aporte externo de espécies com probóscides longas durante os meses quentes e mais úmidos. A distribuição de esfingídeos na Mata Atlântica, e os padrões de similaridade faunística e diversidade β provavelmente são afetados pelas condições de clima, relevo e estrutura vegetacional de cada habitat. A Mata Atlântica pode ser considerada importante centro de diversidade de esfingídeos e funciona como fonte de espécies para os biomas adjacentes. Devido às dinâmicas faunísticas de esfingídeos entre ecossistemas adjacentes dentro e fora da Mata Atlântica, a conservação deste grupo de insetos e dos processos ecossistêmicos associados depende diretamente da manutenção de largas porções de habitat deste bioma altamente ameaçado.

Palavras-chave: Floresta tropical, *hotspot* de biodiversidade, Insecta, Lepidoptera, polinizadores, probóscides, rarefação.

INTRODUÇÃO

A Mata Atlântica é um dos biomas tropicais mais ricos, diversos e ameaçados do planeta (Myers *et al.* 2000, Ribeiro *et al.* 2009). Originalmente sua área se estendia por toda costa do Brasil, desde a região sul ao nordeste ocupando cerca de um milhão e trezentos mil km² ou o equivalente a 15% do território brasileiro. Devido ao antigo histórico de ocupação e ao crescimento populacional explosivo no último século, a Mata Atlântica teve sua área dramaticamente reduzida. Estimativas recentes apontam que restam entre 11 e 16% da vegetação original da Mata Atlântica, porém, fragmentos superiores a 100 ha compõem menos de 8% do que resta do bioma (Ribeiro *et al.* 2009). Esta acelerada e crescente perda de habitat, aliada a excepcional concentração de espécies e endemismos, elevou a Mata Atlântica ao status de um dos 25 *hotspots* globais de biodiversidade prioritários para conservação (Myers *et al.* 2000).

As mariposas da família Sphingidae estão entre os grupos de Lepidoptera melhor inventariados (Kitching & Cadiou 2000). No mundo existem cerca de 1400 espécies de esfingídeos (Kawahara *et al.* 2009), distribuídas em todos os continentes e ilhas, com exceção da Antártica. Entretanto, a maioria das espécies de esfingídeos está concentrada nas regiões tropicais (Kitching & Cadiou 2000). Estimativas para a América do Sul apontam que ocorrem pelo menos 302 espécies o que corresponde a cerca de um quinto da diversidade global do grupo, sendo que o Brasil possui mais de 60% deste total com 186 espécies registradas (I.J. Kitching comunicação pessoal).

A despeito de sua importância tanto como polinizadores, quanto como pragas agrícolas, os esfingídeos têm sido pobremente estudados na região Neotropical. Na Mata Atlântica existem vários estudos faunísticos sobre Sphingidae, com levantamentos pontuais que vão desde a porção nordeste de distribuição do bioma até a região sul do Brasil (Laroca & Mielke 1975, Marinoni *et al.* 1999, Ávila Jr. 2005, Duarte Jr. & Schlindwein 2005, 2008, Duarte *et al.* 2008, Ávila Jr. 2009). Porém, as informações faunísticas sobre este grupo na Mata Atlântica, encontram-se fragmentadas. Não se sabe ao todo, nem

quantas nem quais espécies compõem o bioma, tampouco, como estas espécies se distribuem, ou quais fatores estão associados com a distribuição destas mariposas no que ainda resta de Mata Atlântica.

A distribuição de esfingídeos em determinado ecossistema é afetada por associações biogeográficas com outros ecossistemas, sazonalidade, altitude, grau de perturbação, tamanho do habitat, florística da região, assim como a filogenia (Beck *et al.* 2006a,b,c,d Amorim *et al.* 2009, Ignatov *et al.* 2011). Heterogeneidade de habitat, tanto em termos climáticos (como no caso de ambientes sazonais) quanto em termos vegetacionais, parece influenciar sobremaneira a composição faunística de Sphingidae. Estas mariposas possuem grande capacidade de voo e se deslocam entre habitats distintos em busca de plantas para o forrageamento dos adultos (espécies esfingófilas), assim como espécies hospedeiras para as larvas (Janzen 1986, 1987, 1993, Amorim *et al.* 2009, Ignatov *et al.* 2011). A Mata Atlântica é um bioma com elevada heterogeneidade climática e ambiental. A ampla extensão, tanto em termos latitudinais quanto em termo de longitude, da Mata Atlântica resulta em diferenças marcantes na composição das florestas que compõem o bioma (Ribeiro *et al.* 2009, Joly *et al.* 2012), havendo marcada diferença em termos de composição florestal estendendo-se desde regiões tropicais a subtropicais, bem como em ampla extensão latitudinal (Ribeiro *et al.* 2009). Estas diferenças afetam diretamente a composição faunística de diversos grupos ao longo do mosaico de ecossistemas que constituem o bioma (Goerck 1997, Silva & Casteleti 2003, Silva *et al.* 2004).

Mesmo em escalas geográficas pouco extensas, as diferenças no relevo da Mata Atlântica provocam modificações climáticas drásticas entre áreas muito próximas entre si, o que afeta de forma marcante a composição de espécies vegetais e a estrutura florística do bioma (Joly *et al.* 2012). A Serra do Mar constitui a maior porção remanescente de Mata Atlântica (Ribeiro *et al.* 2009). O seu relevo marcado pela presença de escarpas íngremes produz um gradiente altitudinal que parte desde o nível do mar, até altitudes superiores a 1200 m e em escalas inferiores a 15 km de distância. Estas diferenças tornam a Serra do Mar um ambiente altamente heterogêneo, composto por distintas fisionomias florestais, desde Florestas de Restinga [<5m acima do nível do mar (anm)], Florestas Ombrófilas Densa

de Terras Baixas (5-50m anm), Densa Sub-Montana (entre 50-500m anm) até Densa Montana (500-1200m anm). As diferenças florísticas destas fisionomias vegetativas, certamente implicam em diferenças na fauna associada a cada um destes ecossistemas. Porém, a despeito do que se conhece sobre a flora da Mata Atlântica ao longo de gradientes de altitude na Serra do Mar (Joly *et al.* 2012), pouco se conhece sobre os aspectos faunísticos, especialmente sobre a fauna de Sphingidae, que constitui um grupo de polinizadores com marcada importância para algumas espécies vegetais especializadas e amplamente distribuídas na vegetação da Mata Atlântica.

Neste contexto, este estudo teve como objetivos (1) descrever a fauna de Sphingidae em uma área de Floresta Ombrófila Densa (FOD) Montana, no Parque Estadual da Serra do Mar (PESM) na costa sudeste do Brasil, (2) realizar a comparação faunística direta entre esta área e uma área de FOD de Terras Baixas, ambas situadas dentro da mesma microrregião do PESM, (3) analisar as relações faunísticas entre distintas regiões na Mata Atlântica, além de (4) compilar os dados da literatura para estimar a riqueza e composição de espécies de Sphingidae da Mata Atlântica.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

O estudo foi realizado entre os anos de 2008 e 2009 em área de Floresta Ombrófila Densa Montana no Núcleo Santa Virgínia - NSV (23°17' – 23°24' S / 45°03' – 45°11' W), Parque Estadual da Serra do Mar - PESM. A área total possui extensão de cerca de 5.000 ha e está situada entre os municípios de São Luiz do Paraitinga, Cunha e Ubatuba, no extremo norte do estado de São Paulo - SP (Veloso *et al.* 1991). A altitude varia de 850 m a 1.200 m acima do nível do mar e o clima é tipo Tropical Temperado (Cwa de Köppen 1948), com precipitação média anual superior a 2.000 mm, sendo que mesmo nos meses mais secos a precipitação nunca é inferior a 60 mm (Joly *et al.* 2012).

Levantamento da fauna de esfingídeos

A fauna de esfingídeos foi capturada mensalmente com auxílio de armadilha luminosa, composta por dois tecidos brancos de dimensões de 2,0 x 1,4 m, dispostos em ângulo de 180° graus e iluminados por duas lâmpadas de luz mista de 250 W (Amorim *et al.* 2009). As coletas foram realizadas, de preferência em noites de lua nova que aumenta a eficiência e atratividade da armadilha (Laroca & Mielke 1975), entre março de 2008 e julho de 2009. Os primeiros cinco meses de amostragem foram realizados nas dependências do alojamento do NSV como um piloto e as amostras deste período serão tratadas como coletas não sistematizadas e pouco representativas, devido à presença de várias fontes de perturbações decorrentes da iluminação do alojamento e de habitações no entorno. As demais amostragens, realizadas entre agosto de 2008 e julho de 2009, foram conduzidas em dois pontos de coletas em áreas cuja perturbação externa era praticamente ausente ou pelo menos muito reduzida. Sendo um dos pontos (23° 19' 607"S – 45° 07' 992"W), uma área elevada circundada por um vale e serras com floresta primária, mas em sua maior parte, por floresta secundária. Nesta localidade as luzes da armadilha foram abastecidas pela rede elétrica e possuíam um raio muito amplo de alcance o que proporcionou alta atratividade de insetos noturnos. O segundo ponto (23°19'47.73"S – 45° 4'41.32"W) situou-se no interior da floresta na base de Itamambuca, base de pesquisas do Projeto Biota Gradiente Funcional da FAPESP. Este ponto estava situado no interior da floresta e as coletas foram realizadas com auxílio de um gerador elétrico (modelo Tekna 840 W) abastecido a gasolina. A base de Itamambuca está circundada por floresta num raio de apenas 10m a 15m, o que diminuía a capacidade de dispersão horizontal das luzes da armadilha ocasionando menor atratividade em relação ao primeiro ponto.

As mariposas foram coletadas manualmente, uma a uma, e sacrificadas com solução a 30% de hidróxido de amônia (NH₄OH) injetada na porção ventral do tórax entre os segmentos torácicos. Cada espécime foi acondicionado individualmente em envelope de papel para posterior montagem e identificação. As identificações foram realizadas com auxílio de ilustrações e chaves de identificações

(D'Abrera 1986, Moré *et al.* 2005, CATE Sphingidae 2012). A nomenclatura e a classificação seguiram Kitching & Cadiou (2000) e CATE Sphingidae (2012).

Fauna de Sphingidae na Mata Atlântica

Para avaliar o padrão de distribuição e as relações faunísticas de esfingídeos em distintas áreas da Mata Atlântica, a fauna deste estudo foi comparada com as descritas para outras áreas no bioma. Lançando mão dos dados da literatura para estas comparações, também foi realizada a compilação das espécies de esfingídeos da Mata Atlântica. Estes dados incluíram um total de 15 áreas, das quais nove estão localizadas no estado do Paraná (Laroca & Mielke 1975, Marinoni *et al.* 1999), uma no estado do Rio de Janeiro (Ávila Jr. 2005), três no estado de São Paulo (Duarte *et al.* 2008, Ávila Jr. 2009, presente estudo) e duas no estado de Pernambuco (Duarte Jr. & Schlindwein 2005, 2008).

Análises

Para avaliar as relações entre o clima (temperatura e precipitação) e as mudanças faunísticas (riqueza e abundância mensal) ao longo do ano foram utilizadas análises de correlação de Spearman. Estas análises foram realizadas utilizando as médias mensais de dados climáticos plurianuais (entre os anos de 2008 e 2010) do NSV (Joly *et al.* 2012). Porém, a abundância de esfingídeos capturados em armadilhas noturnas muitas vezes reflete fatores não relacionados ao habitat, como por exemplo, fase lunar e variações nas condições do clima (temperatura e umidade), mesmo em escalas temporais muito curtas, como a noite de coleta (Laroca & Mielke 1975). Neste sentido, para avaliar as mudanças faunísticas de Sphingidae entre os distintos períodos do ano na ausência do efeito da abundância sobre a diversidade de mariposas capturadas a cada mês foi utilizado o índice de diversidade de α de Fisher (Beck *et al.* 2006a, Amorim *et al.* 2009, Beck *et al.* 2011, Fisher *et al.* 1943, Magurran 2004).

O esforço amostral realizado na área de estudos foi avaliado calculando a curva de rarefação baseada em indivíduos para a área (*sensu* Gotelli & Collwel 2001). Similarmente, para avaliar o

esforço amostral total realizado na Mata Atlântica, tomando-se as informações de incidência de espécies em cada área amostrada foi calculada a curva estimada de acumulação de espécies (curva de rarefação baseada em amostras). Para isto, cada área analisada foi considerada como uma amostra. Entretanto, a análise de rarefação parte do pressuposto de que as diferenças entre amostras são resultados apenas de efeitos amostrais e que todos os dados pertencem a um mesmo universo amostral (Gotelli & Colwell 2001). Como para esta análise foram utilizados dados de universos amostrais espacialmente distintos, de forma a avaliar os possíveis vieses causados pela heterogeneidade espacial das amostras foi utilizada a simulação de “*patchiness*” no programa EstimateS para calcular a curva de rarefação baseada em amostras na suposição de ausência de diferenças espaciais (ver guia do usuário do EstimateS em Colwell 2006).

Para comparar a riqueza de espécies observada com a esperada tanto para a área de estudos, quanto para a Mata Atlântica foram utilizados estimadores de riqueza total de espécies. Para a área de estudos, considerando-se as informações de abundância das espécies, foram utilizados os estimadores de riqueza total de Chao 1 e ACE (*abundance-based coverage estimator of species richness*). Para o cálculo do ACE foi utilizado 10 como o limite superior de abundância das espécies raras ou infrequentes (para mais detalhes ver o guia do usuário do EstimateS, Colwell 2006). Para o cálculo da riqueza total esperada para a Mata Atlântica, considerando-se apenas informações de incidência de espécies, foram utilizados os estimadores de riqueza total de Chao 2, e Jackknife de primeira e segunda ordens. Todas estas análises foram realizadas utilizando o software EstimateS 8.0 (Colwell 2006).

As relações faunísticas entre as distintas áreas de Mata Atlântica foram investigadas a partir de análise de agrupamento. O agrupamento foi calculado utilizando dados de incidência de espécies (presença/ausência) nas áreas (Brown & Freitas 2000). Foi utilizada a métrica de distância Euclidiana simples agrupada pelo algoritmo de Ward (método da variância mínima de Ward), de acordo com Brown & Freitas (2000) e Brown & Gifford (2002). Devido ao fato de listas de espécies disponíveis na literatura poderem estar incompletas, sua utilização na determinação de padrões de β -diversidade em

larga escala pode levar a resultados inconsistentes. Portanto, a título de comparação com método mencionado acima, foram utilizados outros métodos de agrupamento (índices de Jaccard e Sørensen agrupados pelo método de média aritmética – UPGMA), de forma a avaliar a robustez do padrão geral. A troca de espécies entre áreas, ou diversidade β , foi calculada como: $1 - \text{índice de similaridade de Jaccard}$, que é expressado como uma proporção, cujos valores próximos de um representam elevada diversidade β ou troca de espécies entre áreas (Sabo *et al.* 2005).

RESULTADOS

Fauna de Sphingidae no Núcleo Santa Virgínia – FOD Montana

No NSV foram coletados 578 esfingídeos, pertencentes a 50 espécies, distribuídas em 20 gêneros (Tabela 1). Os gêneros mais representativos em número de espécies foram *Xylophanes* (11 espécies) e *Manduca* (sete espécies). A espécie mais representativa foi *Adhemarius eurysthenes* (88 indivíduos, 15% da abundância total), seguida por *Xylophanes thyelia* (49 indivíduos, 8,5% da abundância total) e *Xylophanes isaon* (36 indivíduos, 6% da abundância total). As 10 espécies mais abundantes representaram mais de 60% de todas as mariposas capturadas no NSV, ao passo que 36% das espécies amostradas foram raras, tendo sido representadas por até três indivíduos. A tribo Dilophonotini foi a mais representativa, com um total de 19 espécies distribuídas em 11 gêneros, porém a tribo representou apenas 25% da abundância de indivíduos. Número inferior ao da tribo Macroglossini que com 11 espécies e um único gênero (*Xylophanes*), representou 37% da abundância total, seguida pela tribo Sphingini que com 11 espécies distribuídas em três gêneros compôs 16% da fauna de esfingídeos no NSV (Tabela 1).

Tabela 1. Fenologia e composição da fauna de Sphingidae em Floresta Ombrófila Densa Montana do Núcleo Santa Virgínia, Parque Estadual da Serra do Mar - SP.

Espécies	Número de Esfingídeos coletados por mês																Comprimento da	
																	Probóscide (mm)	
	2008								2009								Média ± DP	
Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul		
SMERINTHINAE																		
Ambulycini																		
<i>Adhemarius daphne</i>	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	25,8±0,93	
<i>Adhemarius eurysthenes</i>	-	-	-	-	5	14	11	-	4	-	1	9	3	-	7	7	26,03±1,47	
<i>Adhemarius gannascus</i>	-	-	-	-	-	1	2	1	3	-	-	-	-	2	-	-	26,67±1,57	
<i>Protambulyx strigilis</i>	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	29,37	
<i>Orecta lycidas</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	10,18	
SPHINGINAE																		
Acherontiini																		
<i>Agrius cingulata</i>	-	-	-	-	-	-	2	1	-	-	-	-	-	-	-	1	95,65±8,18	
Sphingini																		
<i>Cocytius beelzebuth</i>	-	-	-	-	-	2	2	1	-	-	-	-	-	-	-	2	83,42±4,98	
<i>Cocytius duponchel</i>	-	-	-	-	-	-	2	2	1	-	-	-	1	-	-	2	84,27±6,44	
<i>Cocytius lucifer</i>	-	-	-	-	-	-	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	75,92±4,76	
<i>Manduca brasiliensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	2	10	-	-	1	9	-	-	-	71,48±7,44	
<i>Manduca diffissa</i>	-	-	-	-	-	-	-	3	11	1	-	6	4	-	-	-	71,44±3,45	
<i>Manduca florestan</i>	1	-	1	-	-	-	-	-	3	1	-	6	3	-	-	-	61,28±4,93	
<i>Manduca janira</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	1	-	1	-	103,53±8,58	
<i>Manduca lefeburii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	53,99	
<i>Manduca rustica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	1	2	-	-	-	132,86±10,17	
<i>Manduca</i> sp.	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	62,68	
<i>Neococytius cluentius</i>	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	197,78±13,69	
MACROGLOSSINAE																		
Dilophonotini																		
<i>Aleuron chloroptera</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	25,91	
<i>Aleuron ypanemae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	16,71	
<i>Callionima innus</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	17,67±0,12	
<i>Callionima nomius</i>	-	-	-	-	1	1	1	1	5	-	1	1	2	-	-	3	16,60±0,95	
<i>Callionima parce</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	18,50±0,08	
<i>Enyo ocypte</i>	-	-	-	-	-	-	1	2	1	-	-	-	-	-	-	-	25,43±0,70	
<i>Erimyis alope</i>	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	1	-	-	-	-	2	43,37±2,69	

Tabela 1. Continuação

Espécies	Número de Esfingídeos coletados por mês																Comprimento da	
	2008								2009								Probóscide (mm)	
	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Média ± DP
<i>Erinnyis ello</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	20	-	2	2	-	-	-	-	1	36,11±1,88
<i>Erinnyis oenotrus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	2	4	-	4	-	-	-	-	-	39,78±3,50
<i>Hemeroplanes longistriga</i>	-	-	-	-	-	2	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1	2	39,70±1,78
<i>Nyceryx alophus</i>	-	-	-	-	-	-	4	7	5	-	-	-	-	-	-	-	1	13,56±1,56
<i>Nyceryx nictitans</i>	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11,64
<i>Pachylia ficus</i>	-	-	-	-	-	2	3	1	-	1	3	1	-	-	-	-	-	48,33±3,32
<i>Pachylioides resumens</i>	-	-	-	-	-	-	1	1	1	-	3	2	2	1	-	-	1	26,70±2,30
<i>Perigonia lusca</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	12,97
<i>Perigonia pallida</i>	-	-	-	-	-	1	-	7	1	5	2	-	1	-	-	-	-	12,15±0,84
<i>Perigonia</i> sp.	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12,50
<i>Pseudosphinx tetrio</i>	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-	47,10±1,40
<i>Unzela japix</i>	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	18,27±0,39
Philampelini																		
<i>Eumorpha analis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	3	-	-	-	-	-	49,19±8,02
<i>Eumorpha obliquus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	1	44,54±0,94
<i>Eumorpha translineatus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	6	2	2	-	1	-	-	-	-	43,18±2,22
Macroglossini																		
<i>Xylophanes aglaor</i>	-	-	-	-	-	3	7	4	2	-	3	-	8	-	-	1	-	34,12±2,33
<i>Xylophanes ceratomioides</i>	-	-	-	-	-	-	3	4	2	2	6	2	10	-	-	-	-	36,15±1,96
<i>Xylophanes chiron</i>	-	-	1	-	-	-	-	-	3	-	1	1	-	1	-	1	-	47,07±3,85
<i>Xylophanes indistincta</i>	-	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	35,75±1,91
<i>Xylophanes isaon</i>	-	-	-	-	-	2	7	-	8	-	-	14	2	-	-	-	3	25,80±3,01
<i>Xylophanes porcus</i>	1	-	-	-	-	-	1	1	11	3	3	-	6	-	-	-	-	22,86±1,85
<i>Xylophanes tersa</i>	-	-	-	-	-	-	2	1	1	-	-	-	3	1	-	-	-	33,23±2,32
<i>Xylophanes thyelia</i>	-	-	3	2	2	2	4	1	8	1	-	2	1	4	14	3	2	30,78±4,53
<i>Xylophanes titana</i>	-	-	-	-	-	-	1	-	11	-	-	-	-	-	-	-	-	36,24±1,32
<i>Xylophanes tyndarus</i>	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	22,52
<i>Xylophanes xylobotes</i>	-	-	-	-	-	1	2	-	2	-	1	5	1	-	-	-	1	33,63±1,73
Nº total de indivíduos/mês	3	0	6	3	9	32	67	42	129	21	35	62	62	10	23	19	55	
Nº total de espécies/mês	3	0	4	2	4	12	27	19	30	10	18	18	19	6	4	9	16	

Não houve qualquer correlação entre a distribuição mensal do número de espécies e da abundância de esfingídeos com os dados de temperatura e precipitação da área (nº indivíduos x temperatura $r_s = 0,480$, $P = 0,113$; nº indivíduos x precipitação $r_s = 0,081$, $P = 0,803$; nº spp. x temperatura $r_s = 0,559$, $P = 0,0586$; nº spp. x precipitação $r_s = 0,253$, $P = 0,428$). Entretanto, durante a estação quente e úmida (outubro a março) ocorreram 40 espécies, das quais 13 foram exclusivas a este período. Ao que passo que durante a estação fria e menos úmida (abril a setembro) foram registradas 34 espécies, entre as quais apenas quatro ocorreram exclusivamente neste período. A sazonalidade na ocorrência de esfingídeos na área foi confirmada pelos valores do índice de diversidade de α de Fisher que foram significativamente maiores nos meses quentes e úmidos (Mann-Whitney (U)_{g,l=10} = 3,50; $Z(U)$ = 2,32; $P = 0,02$). Adicionalmente, a proporção mensal de esfingídeos com probóscides longas (acima de 5,0 cm) em relação aos de probóscides curtas esteve positivamente correlacionada tanto com a temperatura ($r_s = 0,669$, $P = 0,017$), quanto com a precipitação ($r_s = 0,618$, $P = 0,032$). Mariposas com probóscides longas, por sua vez representaram a menor fração (17%, 100 indivíduos) da fauna de Sphingidae registrada no NSV (Fig. 1A).

Relações entre as faunas da FOD Montana e de Terras Baixas no PESM

Assim como no NSV (área de FOD Montana) foram encontradas 50 espécies de esfingídeos na área de FOD de Terras Baixas (Ávila Jr. 2009). Do total de espécies registradas em ambas as áreas do PESM, 48 mariposas foram identificadas ao nível de espécie no NSV e 36 na FOD de Terras Baixas. No total foram registradas 62 espécies para as duas áreas (excluindo as identificadas apenas ao nível de gênero), das quais 23 (37%) ocorreram nas duas fisionomias. O índice de similaridade de Jaccard entre as áreas foi de 0,38 e a diversidade β foi de 0,62.

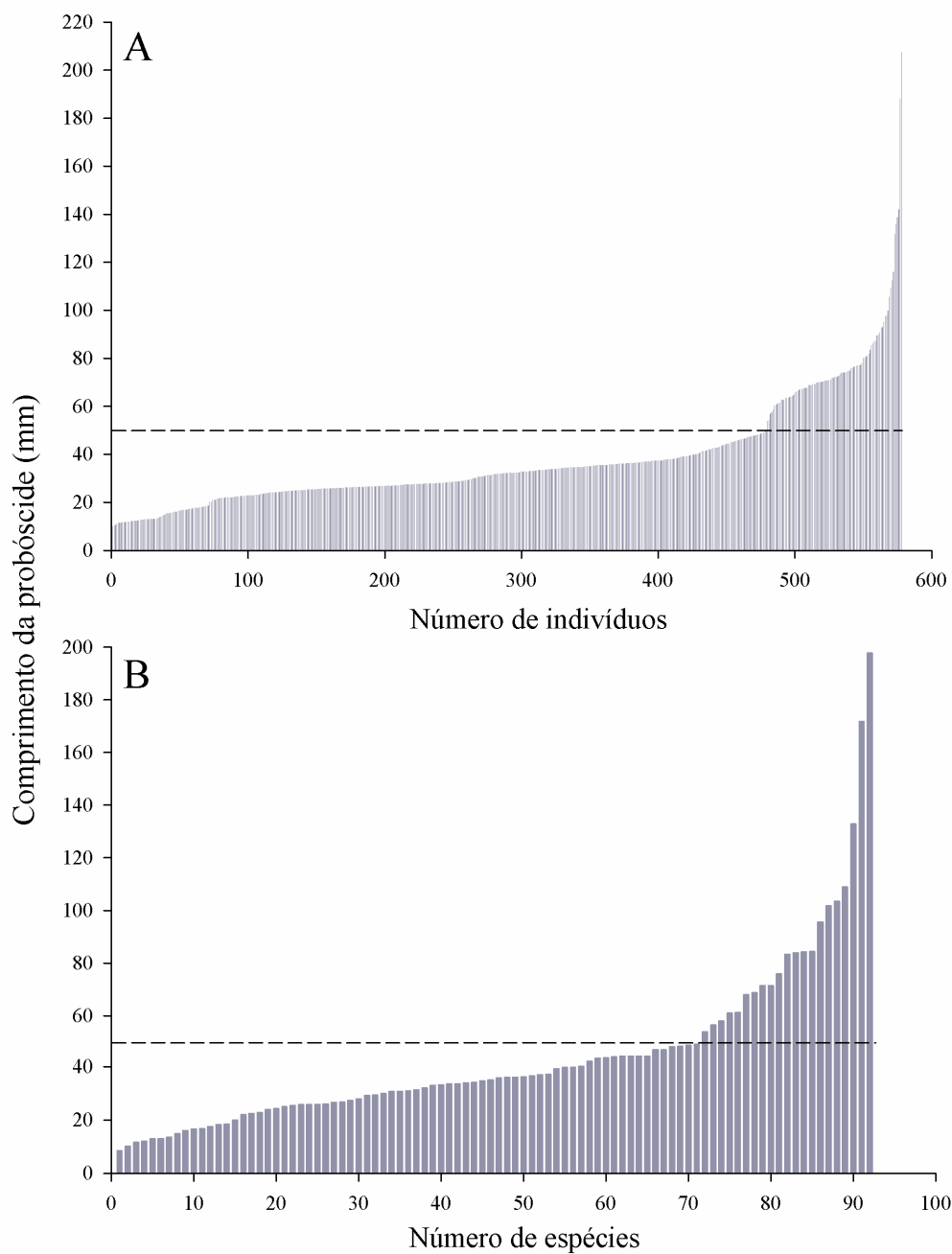


Figura 1. Distribuição do comprimento das probóscides da fauna de Sphingidae de: **A.** Floresta Ombrófila Densa Montana do Núcleo Santa Virgínia, Parque Estadual da Serra do Mar-SP e; **B.** na Mata Atlântica. A linha tracejada em cada diagrama representa a separação de mariposas com probóscides menores e maiores que 50 mm.

Fauna de Sphingidae na Mata Atlântica

Neste bioma foram registradas 116 espécies distribuídas em 28 gêneros (Anexo 1). A tribo Dilophonotini apresentou o maior número de gêneros (16) e de espécies (45), compreendendo cerca de 40% das espécies de esfingídeos da Mata Atlântica. A tribo Macroglossini representada apenas pelo gênero *Xylophanes* apresentou 25 espécies, o que compreendeu cerca de 22% do total, seguida pela tribo Sphingini, com seis gêneros e 23 espécies, o que representa 20% do total de espécies amostradas na Mata Atlântica. *Adhemarius gannascus* foi a espécie mais comum ocorrendo em 14 das 15 áreas amostradas. Apenas oito espécies estiveram amplamente distribuídas tendo ocorrido em 10 áreas ou mais (anexo 1). Mais de 50% das espécies foram registradas em no máximo três áreas, sendo que cerca 30% do total de espécies foi registrada em apenas uma localidade. Das 116 espécies da Mata Atlântica foi obtido o comprimento das probóscides para 92 (80% do total), das quais apenas 21 (23%) apresentaram probóscides acima de 50 mm de comprimento (Fig. 1B).

Relações faunísticas na Mata Atlântica

A análise de agrupamento da fauna de Sphingidae da Mata Atlântica formou dois grupos marcadamente distintos (Fig. 2). O menor grupo incluiu exclusivamente a fauna da região sul do país no estado do Paraná, e o segundo e maior grupo, incluiu faunas desde a região sul até a região nordeste do Brasil. Sendo que para este grupo, as faunas do Estado de Pernambuco formaram um subgrupo melhor definido, ao passo que as faunas dos estados do Paraná, Rio de Janeiro e São Paulo formaram um subgrupo heterogêneo (Fig. 2). As análises realizadas utilizando os índices de Sørensen e Jaccard agrupados pelo método de UPGMA (não ilustrados) resultaram na formação dos mesmos grupos faunísticos, indicando robustez do padrão demonstrado (Fig. 2).

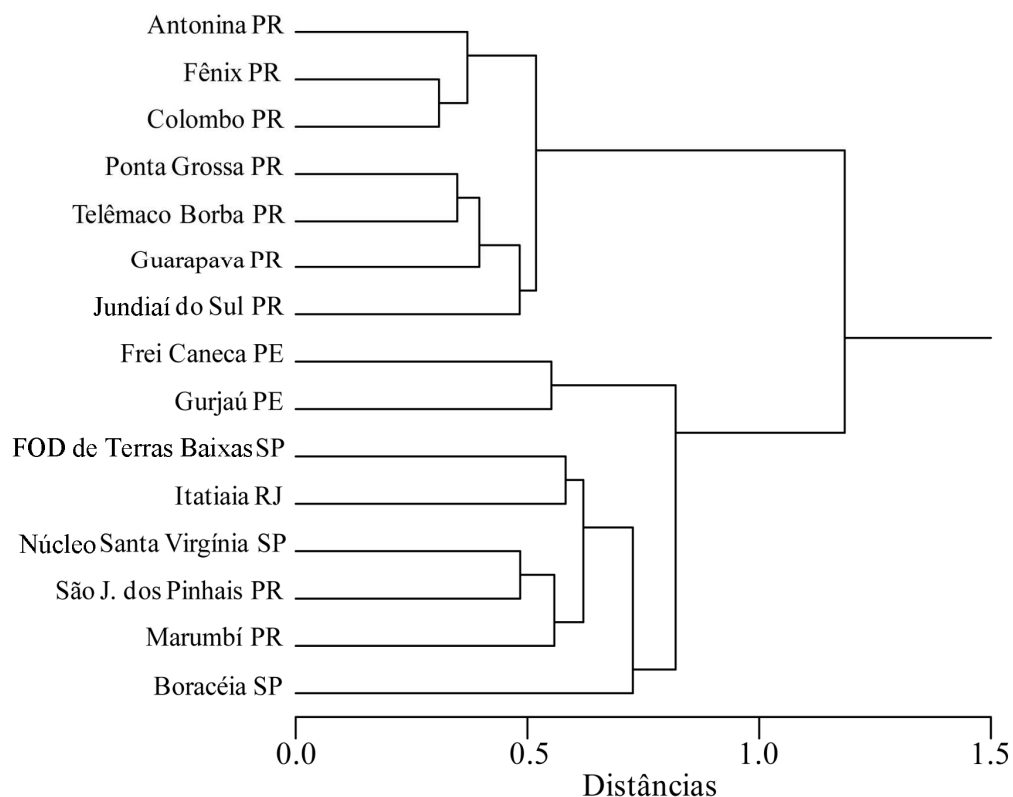


Figura 2. Dendrograma de similaridade de espécies de Sphingidae entre áreas de Mata Atlântica. Análise baseada em informações de incidência de espécies agrupada pelo método da variância mínima de Ward. Fontes: Antonina PR, Fênix PR, Colombo PR, Ponta Grossa PR, Telêmaco Borba PR, Guarapava PR, Jundiá do Sul PR; São José dos Pinhais PR (Marinoni *et al.* 1999) e Marumbí PR (Laroca & Mielke 1975); Gurjaú PE (Duarte Jr. & Schlindwein 2005); Frei Caneca PE (Duarte Jr. & Schlindwein 2008); Itatiaia RJ (Ávila Jr. 2005); FOD de Terras Baixas - SP (Ávila Jr. 2009); Núcleo Santa Virgínia SP (este estudo); Boracéia SP (Duarte *et al.* 2008).

Curvas de rarefação e estimadores de riqueza total de espécies

A curva de rarefação de espécies no NSV não possui inclinação acentuada indicando tendência à assíntota (Fig. 3A). Conforme os valores obtidos pelos estimadores de riqueza total, nota-se que entre 75% (ACE) e 85% (Chao 1) do total de espécies esperado para o NSV foram representadas nas amostragens (Fig. 3A). Apesar de haver claro viés amostral em áreas de Mata Atlântica no sul do país, em especial no estado do Paraná, a curva de rarefação para o bioma como um todo também não se encontra em ascensão, sugerindo também tendência à estabilização (Fig. 3B). Esta tendência geral é corroborada observando os valores dos estimadores de riqueza total de espécies para o bioma. Levando

em consideração os estimadores de riqueza total mais conservadores (Jackknife de 2ª ordem e Chao 2), aproximadamente 78% da fauna de Sphingidae da Mata Atlântica foram registrados neste conjunto de estudos. Mesmo considerando o estimador que indica a riqueza de espécies mais elevada para o bioma (Jackknife de 1ª ordem), o número de espécies registradas para a Mata Atlântica representa que 70% da fauna deste bioma foram efetivamente amostrados (Fig. 3B).

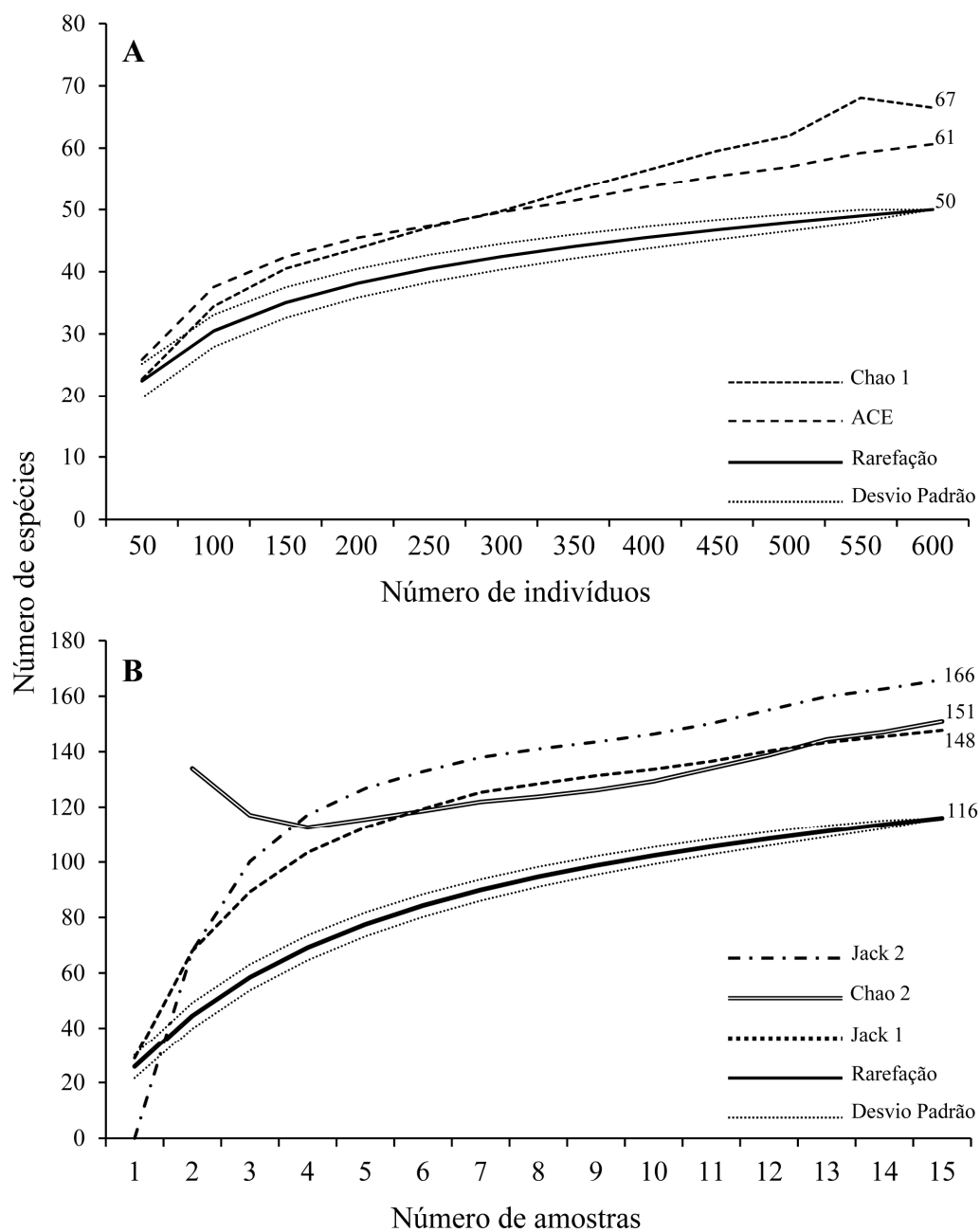


Figura 3. Análise de rarefação e estimadores de riqueza total de espécies. **A.** Curva de rarefação baseada em indivíduos e estimadores de riqueza total da fauna de Sphingidae na Floresta Ombrófila Densa Montana do Núcleo Santa Virgínia, Parque Estadual da Serra do Mar-SP. **B.** Curva de rarefação baseada em amostras e estimadores de riqueza total de espécies para a fauna de Sphingidae em 15 áreas amostradas na Mata Atlântica.

DISCUSSÃO

Diversidade de esfingídeos na Mata Atlântica

O total de espécies até então registradas para a Mata Atlântica representa mais de 60% da fauna de Sphingidae do Brasil e cerca de 40% de todas as espécies conhecidas na América do Sul. Apenas nas áreas de FOD de Terras Baixas e Montana do PESH foram registradas mais de 50% do total de espécies conhecidas para a Mata Atlântica e mais de 30% da fauna brasileira de Sphingidae. Porém, este número representa apenas uma subestimativa do total de espécies do PESH, uma vez que mais de 30% da fauna amostrada na FOD de Terras Baixas (Ávila Jr. 2009) está identificada apenas ao nível de gênero e somente no NSV são esperadas entre 60 e 70 espécies (Fig. 3A). As estimativas atuais apontam a Mata Atlântica como um centro de diversidade da esfingofauna brasileira. A despeito de não haver dados disponíveis para grande porção da Mata Atlântica do estado da Bahia, o que poderia elevar ainda mais o número de espécies para o bioma, os estimadores de riqueza total mais conservadores indicam que a Mata Atlântica engloba no mínimo 80% das espécies de Sphingidae do Brasil, cerca de 50% da fauna da América do Sul e mais de 10% da fauna mundial deste grupo de mariposas.

A Mata Atlântica é importante centro de diversidade e endemismos de muitos grupos de animais e de plantas (Myers *et al.* 2000, Silva & Casteleti 2003), incluindo lepidópteros diurnos (Brown & Freitas 2000). Para a fauna de Sphingidae, possivelmente apenas *Manduca brasiliensis* (espécie relativamente comum no NSV, Tabela 1) e *M. janira* são consideradas espécies endêmicas. Ao passo que a grande maioria das espécies que compõem a esfingofauna do bioma possui distribuição ampla na região Neotropical (Schreiber 1978). A despeito da baixa concentração de endemismos, a elevada diversidade de Sphingidae da Mata Atlântica, possibilita que o bioma funcione como fonte de espécies para os ecossistemas adjacentes como a Caatinga no Nordeste do país (Duarte & Schlindwein 2005b) e a porção sul do Cerrado no sudeste brasileiro (Amorim *et al.* 2009).

Esfingídeos possuem alta capacidade de voo e muitas espécies têm ciclos migratórios deslocando-se entre ecossistemas adjacentes (Janzen 1986, 1987). Especialmente em ambientes marcados por sazonalidade climática, os ciclos migratórios de esfingídeos estão diretamente relacionados com as flutuações faunísticas do grupo (Janzen 1987, Duarte & Schlindwein 2005, Beck *et al.* 2006c, Amorim *et al.* 2009). Algumas espécies de esfingídeos registradas no NSV parecem se deslocar constantemente entre distintas fisionomias da Mata Atlântica ao longo do gradiente altitudinal do PESM. A maior diversidade de esfingídeos durante os meses de maior temperatura e precipitação no NSV, provavelmente está diretamente relacionada com a presença de espécies (em particular espécies com longas probóscides) provenientes da FOD de Terras Baixas. *Agrius cingulata*, *Manduca brasiliensis* e *M. rustica* foram encontradas com cargas polínicas de *Tocoyena bullata* (Rubiaceae) (este estudo), uma espécie de ocorrência exclusiva da vegetação de Restinga em área de terras baixas na Mata Atlântica (Silberbauer-Gottsberger *et al.* 1992). Estas mariposas foram capturadas durante o período de floração de *T. bullata* (Tabela 1, ver Ávila Jr. 2009 para fenologia de espécies esfingófilas em área de FOD de Terras Baixas), o que indica que essas mariposas se deslocam por distâncias superiores a 15 km (menor distância entre o NSV e a área de Restinga mais próxima) ao longo de um gradiente de altitude de cerca de 1 km em um período não superior ao período de floração de *T. bullata*.

Relações faunísticas na Mata Atlântica

Como ocorre em outros ecossistemas tropicais, a distribuição de esfingídeos está relacionada com a estrutura da vegetação, grau de perturbação do habitat, condições climáticas e relevo (*e.g.* Beck *et al.* 2006c, Ignatov *et al.* 2011). Por exemplo, a distribuição de borboletas na Mata Atlântica está subdividida em regiões geográficas relacionadas ao clima e vegetação, formando grupos uniformes que compreendem as faunas do nordeste do país, da região costeira no sudeste, da região de montanhas no sudeste, assim como, das áreas de platô no sul (veja Brown & Freitas 2000). Desta maneira, fatores

ambientais e a estrutura da floresta podem explicar a elevada diversidade β de esfingídeos em áreas muito próximas entre si, como a FOD Montana (NSV) e de Terras Baixas (Núcleo Picinguaba) no PESM (Fig. 2). Ambas as áreas apesar de distantes apenas cerca de 30 km entre si estão localizadas em dois extremos do gradiente altitudinal do PESM, e consequentemente possuem regimes climáticos e composições florísticas marcadamente distintos (Joly *et al.* 2012).

Para as faunas de Sphingidae da região Andino-Amazônica, tanto a composição, quanto a distribuição das mariposas parecem refletir diretamente as mudanças na composição florística ao longo do gradiente altitudinal daquela região (Ignatov *et al.* 2011). Similarmente a riqueza e distribuição de esfingídeos e de outros grupos de mariposas na Mata Atlântica e em outras regiões do planeta, também refletem o gradiente altitudinal (Beck *et al.* 2007, Beck & Kitching 2009, Beck *et al.* 2010, Beck *et al.* 2011, Ferro & Romanowski 2012), assim como, a dieta das larvas destes insetos (Beck & Kitching 2007). Logo, o grupo mais heterogêneo (envolvendo faunas de distintas localidades geográficas) formado pela análise de agrupamento da fauna de Sphingidae da Mata Atlântica, possivelmente deve refletir as similaridades das condições locais de clima, vegetação e relevo ao longo do bioma nas distintas áreas amostradas. Entretanto, uma melhor compreensão das relações faunísticas de Sphingidae no bioma deverá considerar conjuntamente em análises posteriores, fatores ambientais como, temperatura, precipitação, umidade e altitude, assim como, a estrutura da vegetação das distintas localidades.

Esfingídeos como polinizadores na Mata Atlântica

A predominância de espécies da tribo Dilophonotini nas áreas amostradas na Mata Atlântica é semelhante ao padrão geral registrado em distintos biomas na região Neotropical (Schreiber 1978, Haber & Frankie 1989, Motta *et al.* 1998, Darrault & Schlindwein 2002, Gusmão & Creão-Duarte 2004, Duarte & Schlindwein 2005a, Motta & Xavier-Filho 2005, Amorim *et al.* 2009, Ignatov *et al.* 2011). Por outro lado, a predominância de espécies do gênero *Xylophanes* (tribo Macroglossini), assim

como, a ampla distribuição de *Adhemarius gannascus* (tribo Ambulycini) parece ser padrão característico da Mata Atlântica. Este grupo de mariposas por sua vez, compreende predominantemente espécies com probóscides curtas (considerando apenas a fauna do NSV: amplitude das probóscides entre 1,06-5,70 cm; média = $2,95 \pm 0,96$ cm; mediana = 3,14 cm; N=370 indivíduos distribuídos em 31 espécies e 13 gêneros; Fig. 1A). A análise da carga polínica da fauna de esfingídeos no PESM em áreas de FOD de Terras Baixas (Ávila Jr. *et al.* 2010) e Montana (F.W. Amorim, A.M.S. Corrêa, M.A.V Cruz-Barros, M. Sazima dados não publicados) revelam que este grupo de mariposas de probóscides curtas é altamente generalista e visita amplo espectro de plantas, sendo grande parte destas, não associadas à síndrome da esfingofilia.

O pequeno grupo de esfingídeos com probóscides longas do bioma (Fig. 1A-B), por sua vez está relacionado à polinização de um grupo mais restrito de plantas com flores tubulares muito longas (incluindo espécie de Orchidaceae endêmica da FOD Montana Capítulo III e IV), as quais são exclusivamente dependentes destas mariposas para reprodução sexuada (Capítulo III). A presença de esfingídeos de probóscides longas em muitos ecossistemas da Mata Atlântica, como áreas de FOD Montana, por exemplo, parece estar diretamente relacionada com o aporte externo de espécies provenientes de outras formações florestais que compõem o bioma. O deslocamento de esfingídeos entre estas formações de floresta e a conseqüente reprodução de plantas esfingófilas especializadas, entretanto, depende da conectividade entre habitats, cada vez mais reduzida devido à acelerada perda de áreas naturais de Mata Atlântica nas últimas décadas (Myers *et al.* 2000, Ribeiro *et al.* 2009). O PESM constitui o maior corredor ecológico e área de preservação de Mata Atlântica (Ribeiro *et al.* 2009). Neste sentido, a preservação de elevado número de espécies endêmicas e a manutenção de processos ecossistêmicos, como a polinização e reprodução de plantas altamente especializadas, dependem diretamente dos esforços de proteção da maior porção ainda existente deste *hotspot* de biodiversidade prioritário para a conservação em todo planeta (Myers *et al.* 2000).

REFERÊNCIAS

- Amorim FW, Avila Jr. RS, Camargo JA, Vieira A, Oliveira PE. 2009.** A hawkmoth crossroads? Species richness, seasonality and biogeographical affinities of Sphingidae in a Brazilian Cerrado. *Journal of Biogeography* **36**: 662–674.
- Ávila Jr. RS. 2005.** *Biologia reprodutiva de Randia itatiaiae (Rubiaceae): espécie dióica polinizada por lepidópteros diurnos e noturnos no Parque Nacional do Itatiaia, RJ.* Dissertação de Mestrado, Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro-RJ.
- Ávila Jr. RS. 2009.** *A guilda de plantas esfingófilas e a comunidade de Sphingidae em uma área de Floresta Atlântica do Sudeste do Brasil.* Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.
- Ávila Jr. RS, Cruz-Barros MAV, Correa AMS, Sazima M. 2010.** Tipos polínicos encontrados em esfingídeos (Lepidoptera, Sphingidae) em área de Floresta Atlântica do Sudeste do Brasil: uso da palinologia no estudo de interações ecológicas. *Revista Brasileira Botânica* **33**: 415 – 424.
- Beck J, Kitching IJ. 2007.** Correlates of range size and dispersal ability: a comparative analysis of sphingid moths from the Indo-Australian tropics. *Global Ecology and Biogeography* **16**: 341–349.
- Beck J, Kitching IJ. 2009.** Drivers of moth species richness on tropical altitudinal gradients: a cross-regional comparison. *Global Ecology and Biogeography* **18**: 361–371.
- Beck J, Kitching IJ, Linsenmair KE. 2006a.** Effects of habitat disturbance can be subtle yet significant: biodiversity of hawkmoth-assemblages (Lepidoptera: Sphingidae) in Southeast-Asia. *Biodiversity and Conservation* **15**: 465–486.
- Beck J, Kitching IJ, Linsenmair KE. 2006b.** Measuring range sizes of South-East Asian hawkmoths (Lepidoptera: Sphingidae): effects of scale, resolution and phylogeny. *Global Ecology and Biogeography* **15**: 339–348.

- Beck J, Kitching IJ, Linsenmair KE.** 2006c. Determinants of regional species richness: an empirical analysis of the number of hawkmoth species (Lepidoptera: Sphingidae) on the Malesian archipelago. *Journal of Biogeography* **33**: 694–706.
- Beck J, Kitching IJ, Linsenmair KE.** 2006d. Wallace’s line revisited: has vicariance or dispersal shaped the distribution of Malesian hawkmoths (Lepidoptera: Sphingidae)? *Biological Journal of the Linnean Society* **89**: 455–468.
- Beck J, Kitching IJ, Haxaire J.** 2007. The latitudinal distribution of sphingid species richness in continental southeast Asia: What causes the biodiversity ‘hot spot’ in northern Thailand? *The Raffles Bulletin of Zoology* **55**: 179–185.
- Beck J, Altermatt F, Hagmann R, Lang S.** 2010. Seasonality in the altitude–diversity pattern of Alpine moths. *Basic and Applied Ecology* **11**: 714–722.
- Beck J, Brehm G, Fiedler K.** 2011. Links between the environment, abundance and diversity of Andean moths. *Biotropica* **43**: 208–217.
- Brown, KSJr, Freitas AVL.** 2000. Atlantic forest butterflies: indicators for landscape conservation. *Biotropica* **32**: 934–956.
- Brown KS Jr, Gifford DR.** 2002. Lepidoptera in the Cerrado landscape and the conservation of vegetation, soil, and topographical mosaics. In: Oliveira PS, Marquis RJ, eds. *The cerrados of Brazil: ecology and natural history of a Neotropical savanna*. Columbia University Press, New York, 201–222.
- Kitching IJ, Scoble MJ, Smith CR, James S, Young R, Blagoderov V.** 2012. CATE (Creating a Taxonomic E-Science). Sphingidae, Version 1.3. Available: <http://www.cate-sphingidae.org> via the Internet. (accessed July 7, 2012).
- Colwell RK.** 2006. EstimateS: statistical estimation of species richness and shared species from samples, version 8.0. URL <http://www.purl.oclc.org/estimates>. (accessed July 7, August 2008).
- D’Abrera B.** 1986. *Sphingidae mundi. Hawkmoths of the world*. E. W. Classey, Faringdon, UK.

- Darrault OR, Schlindwein C.** 2002. Esfingídeos (Lepidoptera, Sphingidae) no tabuleiro paraibano, nordeste do Brasil: abundância, riqueza e relação com plantas esfingófilas. *Revista Brasileira de Zoologia* **19**: 429–443.
- Duarte Jr. JA, & Schlindwein C.** 2005a. Riqueza, abundância e sazonalidade de Sphingidae (Lepidoptera) num fragmento de Mata Atlântica de Pernambuco, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* **22**: 662–666.
- Duarte Jr. JA, Schlindwein C.** 2005b. The highly seasonal hawkmoth fauna (Lepidoptera: Sphingidae) of the Caatinga of northeast Brazil: a case study in the state of Rio Grande do Norte. *Journal of the Lepidopterists' Society* **59**: 212–218.
- Duarte Jr. JA, Schlindwein C.** 2008. Hawkmoth fauna of a northern Atlantic Rain Forest remnant (Sphingidae). *Journal of the Lepidopterists' Society* **62**: 71–79.
- Duarte M, Carlin LF, Marconato G.** 2008. Light-attracted hawkmoths (Lepidoptera: Sphingidae) of Boracéia, municipality of Salesópolis, state of São Paulo, Brazil. *Check List (UNESP)* **4**: 123–136.
- Ferro VG, Romanowski HP.** 2012. Diversity and composition of tiger moths (Lepidoptera: Arctiidae) in an area of Atlantic Forest in southern Brazil: is the fauna more diverse in the grassland or in the forest? *Zoologia* **29**: 7–18.
- Fisher RA, Corbet AS, Willians CB.** 1943. The relation between the number of species and the number of individuals in a random sample of an animal population. *The Journal of Animal Ecology* **12**: 42–58.
- Goerck JM.** 1997. Patterns of rarity in the birds of the Atlantic Forest of Brazil. *Conservation Biology* **11**: 112–118.
- Gotelli NJ, Colwell RK.** 2001. Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. *Ecology Letters* **4**: 379–391.

- Gusmão MAB, Creão-Duarte AJ.** 2004. Diversidade e análise faunística de Sphingidae (Lepidoptera) em área de brejo e caatinga no Estado da Paraíba, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* **21**: 491–498.
- Haber WA, Frankie GW.** 1989. A tropical hawkmoth community: Costa Rican dry forest Sphingidae. *Biotropica* **21**:155–172.
- Ignatov II, Janovec JP, Centeno P, Tobler MW, Grados J, Lamas G, Kitching IJ.** 2011. Patterns of richness, composition, and distribution of sphingid moths along an elevational gradient in the Andes-Amazon region of southeastern Peru. *Annals of the Entomological Society of America* **104**: 68 – 76.
- Janzen DH.** 1986. Biogeography of an unexceptional place: what determines the saturniid and sphingid moth fauna of Santa Rosa National Park, Costa Rica, and what does it mean to conservation biology? *Brenesia* **25/26**: 51– 87.
- Janzen DH.** 1987. How moths pass the dry season in a Costa Rican dry forest. *Insect Science and its Applications* **8**: 489 – 500.
- Janzen DH.** 1993. Caterpillar seasonality in a Costa Rican dry forest. In: Stamps NE, Casey TM, eds. *Caterpillars: ecological and evolutionary constraints on foraging*. Chapman & Hall, New York, 448 – 477.
- Joly CA, Assis MA, Bernacci LC, Tamashiro JY, Campos MCR, Gomes JAMA, et al.** 2012. Floristic and phytosociology in permanent plots of the Atlantic Rainforest along an altitudinal gradient in southeastern Brazil. *Biota Neotropica* **12**: 123-145.
- Kawahara AY, Mignault AA, Regier JC, Kitching IJ, Mitter C.** 2009. Phylogeny and biogeography of hawkmoths (Lepidoptera: Sphingidae): Evidence from five nuclear genes. *PLoS ONE* **4**: e5719.

- Kitching IJ, Cadiou, JM.** 2000. *Hawkmoths of the world: an annotated and illustrated revisionary checklist (Lepidoptera: Sphingidae)*. Cornell University Press, Ithaca.
- Köppen W.** 1948. *Climatologia*. Fondo de Cultura Econômica, México.
- Laroca S, Mielke OH.** 1975. Ensaios sobre a ecologia de comunidade em Sphingidae na Serra do Mar, Paraná, Brasil (Lepidoptera). *Revista Brasileira de Biologia* **35**: 1 – 19.
- Magurran AE.** 2004. *Measuring biological diversity*. Blackwell.
- Marinoni RC, Dutra RRC, Mielke OHH.** 1999. Levantamento da fauna entomológica no Estado do Paraná. IV. Sphingidae (Lepidoptera). Diversidade alfa e estrutura de comunidade. *Revista Brasileira Zoologia* **16**: 223 – 240.
- Moré M, Kitching IJ, Cocucci AA.** 2005. *Hawkmoths of Argentina*. LOLA, Buenos Aires.
- Motta CS, Xavier-Filho FF.** 2005. Esfingídeos (Lepidoptera, Sphingidae) do município de Beruri, Amazonas, Brasil. *Acta Amazonica* **35**: 457 – 462.
- Motta CS, Aguilera-Peralta FJ, Andreazze R.** 1998. Aspectos da esfingofauna (Lepidoptera, Sphingidae), em área de terra-firme, no estado do Amazonas, Brasil. *Acta Amazonica* **28**: 75 – 92.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GAB, Kent J.** 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* **403**: 853 – 858.
- Ribeiro MC, Metzger JP, Martensen AC, Ponzoni FJ, Hirota MM.** 2009. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation* **142**: 1141 – 1153.
- Sabo JL, Sponseller R, Dixon M, Gade K, Harms T, Heffernan J, Jani A, Katz G, Soykan C, Watts J, Welter J.** 2005. Riparian zones increase regional species richness by harboring different, not more, species. *Ecology* **86**: 56 – 62.
- Schreiber H.** 1978. Dispersal centers of Sphingidae (Lepidoptera) in the Neotropical region. *Biogeografica* **10**: 1 – 195.

- Silberbauer-Gottsberger I, Gottsberger G, Ehrendorfer F.** 1992. Hybrid speciation and radiation in the neotropical woody genus *Tocoyena* (Rubiaceae). *Plant Systematics and Evolution* **181**: 143 – 169.
- Silva JMC, Casteleti CHM.** 2003. Status of the biodiversity of the Atlantic Forest of Brazil. In: Galindo-Leal C, Câmara IG. eds. *The Atlantic Forest of south America: Biodiversity status, threats, and outlook*. CABS and Island Press, Washington, 43 – 59.
- Silva JMC, Souza MC, Castelletti CHM.** 2004. Areas of endemism for passerine birds in the Atlantic Forest, South America. *Global Ecology and Biogeography* **13**: 85 – 92.
- Veloso HP, Rangel-Filho ALR, Lima JCA.** 1991. *Classificação da Vegetação Brasileira, Adaptada a um Sistema Universal*. IBGE, Departamento de Recursos Naturais e Estudos Ambientais.

Anexo 1. Espécies de mariposas Sphingidae registradas na Mata Atlântica. Fontes: PR MA (Laroca & Mielke 1975); PR AN, PR SJ, PR CO, PR PG, PR TB, PR JS, PR GU e PR FE (Marinoni *et al.* 1999); RJ ITA (Ávila Jr. 2005); SP BO (Duarte *et al.* 2008); SP PIC (Ávila Jr. 2009); SP SV (presente estudo); PE GU (Duarte Jr. & Schlindwein 2005); PE FC (Duarte Jr. & Schlindwein 2008).

	Localidades														
	MA PR	NA PR	SJ PR	CO PR	PG PR	TB PR	JS PR	GU PR	FE PR	ITA RJ	BO SP	PIC SP	NSV SP	GUR PE	FC PE
SMERINTHINAE															
Ambulycini															
<i>Adhemarius daphne</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-
<i>Adhemarius eurysthenes</i>	1	1	1	-	1	1	-	-	-	-	1	-	1	-	-
<i>Adhemarius gagarini</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
<i>Adhemarius gannascus</i>	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Adhemarius germanus</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Adhemarius palmeri</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-
<i>Protambulyx astygonus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
<i>Protambulyx eurycles</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-
<i>Protambulyx strigilis</i>	1	-	1	1	1	1	1	-	-	1	1	1	1	1	1
<i>Protanbulyx goeldii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
<i>Orecta lycidas</i>	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-
SPHINGINAE															
Acherontiini															
<i>Agrius cugulata</i>	1	1	1	1	-	-	-	-	1	1	1	-	1	-	1
Sphingini															
<i>Amphimoea walkeri</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	1
<i>Cocytius antaeus</i>	1	-	-	-	-	-	1	-	1	-	1	1	-	1	1
<i>Cocytius beelzebuth</i>	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-
<i>Cocytius duponchel</i>	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	-	-
<i>Cocytius lucifer</i>	1	-	1	-	-	-	-	-	-	1	1	-	1	-	-
<i>Manduca albiplaga</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
<i>Manduca brasiliensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	-
<i>Manduca clarki</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Manduca contracta</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Anexo 1. Continuação

	Localidades														
	MA PR	NA PR	SJ PR	CO PR	PG PR	TB PR	JS PR	GU PR	FE PR	ITA RJ	BO SP	PIC SP	NSV SP	GUR PE	FC PE
<i>Manduca contracta</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Manduca dalica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-
<i>Manduca diffissa</i>	1	-	1	1	-	-	1	1	1	-	1	-	1	-	1
<i>Manduca florestan</i>	1	-	1	1	-	-	1	1	-	1	1	1	1	-	1
<i>Manduca hannibal</i>	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-	1	1
<i>Manduca incisa</i>	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-
<i>Manduca lefeburii</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-
<i>Manduca lichenea</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
<i>Manduca lucetius</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-
<i>Manduca pellenia</i>	1	-	1	-	1	1	1	1	-	-	-	-	1	-	-
<i>Manduca rustica</i>	1	-	-	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	1	1
<i>Manduca sexta</i>	-	-	-	-	-	-	1	1	-	1	1	-	-	-	1
<i>Neococytius cluentius</i>	1	-	-	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	-	-
<i>Neogene dynaeus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
<i>Sphinx justiciae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
MACROGLOSSINAE															
Dilophonotini															
<i>Aellopos fadus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
<i>Aellopos titan</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
<i>Aleuron chloroptera</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
<i>Aleuron ypanemae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
<i>Aleuron iphis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Callionima falcifera</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Callionima grisencens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Callionima inuus</i>	1	1	-	-	-	-	1	-	-	-	1	1	1	-	1
<i>Callionima nomius</i>	1	-	1	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	-	1
<i>Callionima parce</i>	1	-	1	-	1	-	1	-	-	1	1	-	1	-	1

Anexo 1. Continuação

	Localidades														
	MA PR	NA PR	SJ PR	CO PR	PG PR	TB PR	JS PR	GU PR	FE PR	ITA RJ	BO SP	PIC SP	NSV SP	GUR PE	FC PE
<i>Enyo gorgon</i>	-	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-
<i>Enyo lugubris</i>	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	1
<i>Enyo ocypte</i>	1	-	1	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1	1
<i>Erinnyis alope</i>	1	1	1	-	1	-	1	-	-	-	1	1	1	1	1
<i>Erinnyis crameri</i>	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
<i>Erinnyis domingonis</i>	-	1	1	1	1	1	1	-	1	-	-	-	-	-	-
<i>Erinnyis ello</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	1	1
<i>Erinnyis lassauxii</i>	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
<i>Erinnyis obscura</i>	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
<i>Erinnyis oenotrus</i>	1	-	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	-	-
<i>Erinnyis satellitia</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Hemeroplanes longistriga</i>	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	1	-	1	-	-
<i>Hemeroplanes ornatus</i>	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
<i>Hemeroplanes triptolemus</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	1
<i>Hyles euphorbarium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
<i>Isognathus allamandae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
<i>Isognathus caricae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
<i>Isognathus leachii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1
<i>Isognathus menechus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Isognathus swainsonii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Madoryx plutonius</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	1
<i>Nyceryx alopheus</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-
<i>Nyceryx coffaëae</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-
<i>Nyceryx continua</i>	-	-	1	-	1	1	-	1	-	-	1	-	-	-	-
<i>Nyceryx nictitans</i>	-	-	-	-	1	1	-	1	-	-	1	-	1	-	-
<i>Oryba kadeni</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-

Anexo 1. Continuação

	Localidades														
	MA PR	NA PR	SJ PR	CO PR	PG PR	TB PR	JS PR	GU PR	FE PR	ITA RJ	BO SP	PIC SP	NSV SP	GUR PE	FC PE
<i>Pachylia ficus</i>	1	-	1	-	-	-	1	-	1	1	1	1	1	-	1
<i>Pachylia syces</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-
<i>Pachylioides resumens</i>	1	1	1	-	-	1	-	1	1	-	1	1	1	-	1
<i>Perigonia lusca</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-
<i>Perigonia pallida</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-
<i>Perigonia passerina</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
<i>Perigonia stulta</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-
<i>Pseudosphynx tetrico</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1	1
<i>Unzela japix</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
Philampelini															
<i>Eumorpha analis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-
<i>Eumorpha anchemolus</i>	1	-	1	-	-	-	1	-	-	1	1	-	-	1	1
<i>Eumorpha fasciatus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	1	1
<i>Eumorpha labruscae</i>	1	-	1	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	1
<i>Eumorpha megaeacus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
<i>Eumorpha obliquus</i>	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	1
<i>Eumorpha phorbis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
<i>Eumorpha satellitia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
<i>Eumorpha translineata</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	1	-	-
<i>Eumorpha vitis</i>	1	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	1
Macroglossini															
<i>Xylophanes aglaor</i>	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-
<i>Xylophanes amadis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Xylophanes anubus</i>	1	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	1	-	-	1
<i>Xylophanes ceratomioides</i>	1	1	1	1	1	-	-	-	-	1	1	1	1	-	-
<i>Xylophanes chiron</i>	1	1	1	1	-	-	-	-	1	1	1	1	1	-	1

Anexo 1. Continuação

	Localidades														
	MA PR	NA PR	SJ PR	CO PR	PG PR	TB PR	JS PR	GU PR	FE PR	ITA RJ	BO SP	PIC SP	NSV SP	GUR PE	FC PE
<i>Xylophanes cosmius</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
<i>Xylophanes elara</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
<i>Xylophanes eumedon</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Xylophanes guianensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
<i>Xylophanes hydrata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
<i>Xylophanes indistincta</i>	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-	1	-	1	-	-
<i>Xylophanes isaon</i>	-	1	1	-	-	-	-	-	-	1	1	-	1	-	-
<i>Xylophanes libya</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	1
<i>Xylophanes loelia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	1
<i>Xylophanes marginalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
<i>Xylophanes pistacina</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
<i>Xylophanes pluto</i>	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	1	-	-	-	1
<i>Xylophanes porcus</i>	1	-	1	-	1	-	-	-	-	1	1	1	1	-	-
<i>Xylophanes schausi</i>	1	-	1	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-
<i>Xylophanes tersa</i>	1	-	1	1	-	-	1	1	-	-	1	1	1	1	1
<i>Xylophanes thyelia</i>	1	1	1	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	-	1
<i>Xylophanes titana</i>	-	-	1	-	-	1	1	-	-	1	1	1	1	-	-
<i>Xylophanes tyndarus</i>	1	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
<i>Xylophanes xylobotes</i>	1	-	1	1	1	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-
<i>Xylopohanes zikani</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

MA PR: Marumbí – Paraná; NA PR: Antonina – Paraná; SJ PR: São José dos Pinhais – Paraná; CO PR: Colombo – Paraná; PG PR: Ponta Grossa – Paraná; TB PR: Telêmaco Borba – Paraná; JS PR: Jundiá do Sul – Paraná; GU PR: Guarapava – Paraná; PR FE: Fênix – Paraná; ITA RJ: Itatiaia – Rio de Janeiro; BO SP: Boracéia – São Paulo; PIC SP: Picinguaba – São Paulo; NSV SP: Núcleo Santa Virgínia – São Paulo; GUR PE: Gurjaú – Pernambuco; FC PE: Frei Caneca – Pernambuco.

CAPÍTULO III

Pollination contrivances of highly specialized hawkmoth-pollinated species in a
Montane Atlantic Rainforest of south-eastern Brazil §

§ Manuscrito submetido para publicação no periódico *Annals of Botany*: Amorim F.W., Wyatt G., Sazima M. 2012. Pollination contrivances of highly specialized hawkmoth-pollinated species in a Montane Atlantic Rainforest of south-eastern Brazil.

ABSTRACT

Background and aims Flowering plants have evolved a remarkable variety of adaptations to pollination by distinct groups of animals. Highly specialized hawkmoth-pollinated flowers have elaborate mechanisms to enhance pollen transfer but are prone to pollinator limitation due to low abundances of long-tongued moths.

Methods This study was conducted in a highland Atlantic Rainforest in south-eastern Brazil and focused on four sympatric, highly specialized species pollinated by hawkmoths. We assessed phenology, floral morphology, breeding system, nectar traits (volume, concentration, amount of sugars and occurrence of sugar gradients along floral tubes), pollination mechanisms and pollinator assemblage (by monthly hawkmoth collection, observation of floral visitors and pollen analysis).

Key Results The flowering phenology of the four species showed non-overlapping peaks of intensity and coincided with high abundances of long-tongued hawkmoths at the study site. Mean flower lengths ranged from 8.07 to 13.8 cm among species and mean nectar volumes from 28.5 to 44.5 μL . In two orchid species, sugar concentrations increased from top to bottom of the floral spurs, and pollinaria were attached to the eyes or palps. In contrast, two species of Rubiaceae had pollen carried on hawkmoth proboscises in two distinct ways: stuck on by stigmatic secretions or by pollen catapult mechanisms. All four species were self-compatible, but dependent on pollinators to set fruit. Long-tongued hawkmoths were the main pollinators of each, and most hawkmoths in the assemblage had tongues shorter than the floral tubes of the studied species.

Conclusions The results suggest that fluctuations in the hawkmoth assemblage may affect fruit production by pollinator-limitation in plants with a highly specialized pollination system. The occurrence of nectar sugar gradients, recorded for the second time in this study, function as a compelling mechanism which encourages long-tongued hawkmoths to contact their heads to the floral reproductive structures and may be widespread in long-spurred sphingophilous orchids.

Key words: *Habenaria*; hawkmoth; *Hillia parasitica*; nectar sugar gradient; plant-pollinator traits; pollinator limitation; *Posoqueria latifolia*.

INTRODUCTION

Plant-pollinator interactions promote reciprocal selection between floral and pollinator traits, resulting in changes to the morphologies of plants and pollinators within populations and across landscapes (Waser *et al.*, 1996; Altshuler and Clark, 2003; Temeles and Kress, 2003; Gómez and Perfectti 2010; Johnson, 2010). These interactions may become highly specific, to the point where they are recognized as an outcome of coevolutionary processes (Nilsson, 1988; Anderson and Johnson, 2008; Pauw *et al.*, 2009). On the other hand, pollinators can also exert unidirectional selective pressures capable of driving specialization and evolution of flowering plants (Stebbins, 1970; Wasserthal, 1997; Whittall and Hodges, 2007; Hodges and Whittall, 2008; Tripp and Manos, 2008).

The subject of generalized versus specialized pollination systems has been discussed thoroughly in recent decades (*e.g.* Stebbis, 1970; Waser, 1996; Ollerton *et al.*, 2009). Certainly a continuum exists between these extremes, and evolution can drive a species to one endpoint or the other (Whittall and Hodges, 2007; Tripp and Manos, 2008). Darwin (1862) first observed some of the most remarkable examples of specialized pollination systems involving orchids and their long-tongued hawkmoth pollinators. Specialized pollination systems, resulting from either coevolutionary race, pollinator shift mode, or resource competition (see Nilsson *et al.*, 1988; Wasserthal, 1997; Whittall and Hodges, 2007; Rodríguez-Gironés and Santamaría, 2006; 2007; Rodríguez-Gironés and Llandres, 2008) are characterized by the suite of traits which promote sexual reproduction of the plant and acquisition of rewards by the pollinators. Examples of these traits are a matching phenology between plant and pollinator, morphological fitting between pollinator and reproductive organs of flowers, and the availability of rewards which can satisfy the metabolic or reproductive needs of the pollinator. Since plants with specialized pollination systems require specific pollinators for pollination service, specialized pollination systems are often characterized by pollen limitation because of spatiotemporal fluctuations in the pollinator fauna (Huang and Fenster, 2007; Zhang *et al.*, 2011).

Tropical ecosystems present a high diversity of pollinators, and sphingid moths are among the major pollinators in tropical forests (Bawa *et al.*, 1985; Haber and Frankie 1989; Oliveira *et al.*, 2004). The long proboscises of these moths allow access to nectar in a wide variety of flowers, including species that are not primarily adapted to sphingophily (Kislev *et al.*, 1972; Haber and Frankie 1989; Darrault and Schlindwein, 2002). Flowers adapted to pollination by these moths may have extremely specialized morphologies, i.e. long-tubed flowers, nocturnal anthesis, and scent production, resulting in the exclusive pollination by hawkmoths with very long proboscises (Nilsson *et al.*, 1987; Haber and Frankie, 1989; Wasserthal, 1997; Martins and Johnson, 2007). On the other hand, long-tongued hawkmoths may not depend exclusively on specialized sphingophilous plants. These moths have generalist feeding habits and visit a wide variety of plants, including short- and long-tubed flowers (Kislev *et al.*, 1972; Haber and Frankie, 1989; Darrault and Schlindwein, 2002). Consequently, despite a very specialized pollination system, sphingophilous plants rely on these generalist pollinators to transport pollen and set fruits (Nilsson *et al.*, 1987; Haber and Frankie, 1989).

Long-tubed, hawkmoth-pollinated plants are prone to pollinator-limitation due to spatiotemporal fluctuations in hawkmoth populations (Janzen, 1986; 1987), as well as the lower abundance of long-tongued versus short-tongued hawkmoths (Haber and Frankie, 1989). The loss of long-tongued moths can substantially impair sexual reproduction of these plants (Huang and Fenster, 2007; Zhang *et al.*, 2011), and possibly lead to extinction (Tripp and Manos, 2008). Therefore, natural selection may favor the evolution of features that optimize sexual reproduction in this group of plants (Moeller, 2006).

In this context, the objective of this study was to investigate the pollination mechanisms, floral biology, and breeding system of the most specialized hawkmoth-pollinated plants (i.e., those with the longest floral tubes) in a Montane (highland) forest of the Atlantic Rainforest of south-eastern Brazil: *Habenaria johannensis* Barb. Rodr., *H. paulistana* J.N.Bat. & Bianc. (Orchidaceae), *Hillia parasitica* Jacq. (Rubiaceae, Hillieae), and *Posoqueria latifolia* (Rudge) Roem. & Schult. (Rubiaceae,

Posoqueriae). Our main goal was to characterize the mechanisms by which cross-fertilization is achieved in species with extremely long floral tubes and to determine their interactions with long-tongued pollinators. We therefore obtained data regarding: (1) flowering phenology, (2) pollen attachment to the pollinator's body, (3) nectar traits (volume, concentration, amount of sugars and occurrence of sugar gradients along floral tubes), and (4) pollination mechanisms and pollinator assemblage (by monthly hawkmoth collection, field observation of floral visitors and pollen analysis).

MATERIAL AND METHODS

Study site and species characterization

This study was conducted between the years 2008 and 2011 in an highland Atlantic Rainforest area (Montane Ombrophilous Dense Forest) in the Núcleo Santa Virginia (NSV: 23°17' – 23°24' S / 45°03' – 45°11' W), of the Serra do Mar State Park - SMSP, São Paulo state, south-eastern Brazil. The total area encompassed by the reserve is approximately 5,000 ha, and it is situated between the municipalities of São Luis do Paraitinga, Cunha, and Ubatuba (Veloso *et al.*, 1991). The elevation varies from 850 to 1,200 m a.s.l. and the climate is Tropical Temperate (Cwa according to Köppen, 1948), with average annual precipitation above 2,000 mm and never falling below 60 mm during the driest months (Joly *et al.*, 2012).

In South America, hawkmoth-pollinated orchids with very long nectar spurs are represented mainly by the cosmopolitan genus *Habenaria* section *Macroceratitae* (Dressler, 1993; Batista *et al.*, 2006). Brazil is a centre of diversity for this group, and the genus includes terrestrial species with nectar spurs formed by the elongated labellum, which may reach up to 20 cm in length in some species (Batista *et al.* 2006). *Habenaria johannensis* (Fig. 1A) and *Habenaria paulistana* (Fig. 1B) occur in NSV on wet soils associated with pastures bordering the forest, along creeks and rivers, and along roadside clearings. Despite being geographically sympatric, populations of these species do not occur

in the same microhabitats in the NSV. *Habenaria johannensis* is widely distributed in Brazil, from areas of Cerrado in central Brazil extending south-eastward to the Atlantic Rainforest in the south and south-east (Batista *et al.*, 2006). In the NSV, *H. johannensis* occurs only in roadside clearings along the Oswaldo Cruz state highway (SP-125), which crosses an area where cloud influence is lessened and therefore less humid. *Habenaria paulistana* is endemic to the Atlantic Rainforest of São Paulo state (Batista *et al.*, 2006), and is restricted to extremely humid areas in pastures and along the edges of creeks near forest borders.

Hillia parasitica (Fig. 1C) and *Posoqueria latifolia* (Fig. 1D) are woody species with a wide distribution in the Neotropics (Taylor, 1994; Delprete, 2009). *Hillia parasitica* is a facultative epiphytic shrub and occurs in the NSV in both canopy treetops or in forest borders on rocks, soil, and along rivers. In the NSV, *P. latifolia* occurs in the forest borders, where they grow only 6 to 8 m tall, and also in the forest interior, where they may reach up to 18 m in height.



Figure 1. Floral morphology of the four most specialized hawkmoth-pollinated species in an area of the Montane Ombrophilous Dense forest in the Núcleo Santa Virgínia, Serra do Mar State Park, south-eastern Brazil. **A.** *Habenaria johannensis*; **B.** *Habenaria paulistana*; **C.** *Hillia parasitica* and **D.** *Posoqueria latifolia*.

Phenology and floral biology

Floral phenology of the four species was observed during the years 2009-2011, with the exception of *H. johannensis*, which flowering was observed only in 2010 and 2011. Flowering intensity in each species was quantified by assigning numerical scores from 0 to 3, with 0 indicating the absence

of flowers and 1, 2, and 3 indicating presence in the following percentage intervals: 1%-25%, 26%-75%, and 76%-100% of the plants observed with flowers. The flowering intensities of *Hillia parasitica* and *P. latifolia* were quantified from 10 plants per season, and those of *Habenaria johannensis* and *H. paulistana* were quantified from 30 plants per season. Flowering patterns were then classified following Newstrom *et al.* (1994).

Floral anthesis was recorded on marked flowers on 5 - 20 plants per species. At least 10 flowers per plant were observed from flower opening until senescence, which was characterized by shriveling or falling of floral parts. Stigmatic receptivity was tested using a solution of 20% hydrogen peroxide (Kearns and Inouye, 1993). The emission of floral odours was analysed qualitatively in the field from fully open flowers during both night and day periods. Flowers collected from different plants (2 - 10 plants per species) were sealed in glass jars for 10 - 15 minutes and floral odors were qualitatively described (Kearns and Inouye, 1993).

Digital callipers (error, ± 0.01 mm) were used to measure the length of the floral tube of fresh flowers for each species. For *H. johannensis*, a total of 110 flowers were measured, representing 1-2 flowers per plant from 63 individuals, and of *H. paulistana* 86 flowers were measured, one flower per plant. Corolla tubes were measured for 64 flowers of *Hillia parasitica* (4 - 8 flowers per plant from 14 individuals) and 110 flowers of *P. latifolia* flowers (5 - 10 flowers per plant from 15 individuals).

Nectar analysis was conducted on the four species by extracting and measuring of volumes using glass micro capillaries and subsequently measuring the sugar concentration (percentage of sucrose, mass/mass), using a manual pocket refractometer (Kearns and Inouye, 1993; Galetto and Bernardello, 2005). The amount of sugar in the nectar was calculated following Galetto and Bernardello (2005). The occurrence of nectar sugar concentration gradients along the floral tubes of the four species was evaluated using the method of Martins and Johnson (2007). This analysis was performed on a total of 20 flowers, representing two flowers from 10 individuals of each species. Subsequently, the length of each floral tube and the nectar column formed by accumulated nectar were

measured using digital callipers (error, ± 0.01 mm). For this purpose flowers were covered for a period of 48h using nylon mesh bags. They were then collected, and the floral tubes were carefully sectioned into 1.0 cm segments using histological blades. Finally, we measured nectar volume and concentration in each one of these segments.

Breeding system

To study the breeding system of each species, controlled pollinations were conducted during the years 2009 and 2011. Unopened flowers were isolated from visitors using nylon mesh bags on 20 plants of *Habenaria johannensis* and of *H. paulistana*, on 10 plants of *Hillia parasitica*, and on eight plants of *P. latifolia*. For this experiment, only individuals spaced at least 10 m from the nearest individual of the same species were selected for bagging, so as to reduce the chances of cross-pollination between clones produced by vegetative propagation. The following treatments were done: cross-pollination (flowers emasculated and hand-pollinated with pollen from other plants); self-pollination (flowers hand-pollinated with pollen from the same plant); autonomous self-pollination (unmanipulated flowers kept bagged); emasculation (flowers emasculated prior to anthesis to rule out fruit formation by apomixis); and a control (flowers marked but not bagged, remaining accessible to pollinators). The index of self-incompatibility (ISI *sensu* Bullock 1985) was calculated as the ratio between the number of fruits formed from self-pollinations/cross-pollinations. The upper limit adopted to consider a species self-incompatible was 0.25 (following Oliveira & Gibbs 2000).

Ovaries and pistils from cross- and self-pollinations were collected in order to observe pollen tubes under fluorescence microscopy. Flowers of the orchid species were collected 20 days after hand-pollination treatments and those of the Rubiaceae species were collected 24 hours after that treatment. Ovaries and pistils were subsequently fixed in a solution of formalin, acetic acid, and 50% ethyl alcohol. After 24h, ovaries and pistils were transferred to a 70% ethyl alcohol solution, and pollen tubes were observed under a fluorescence microscope (Martin 1959). For this analysis 10 flowers

collected from 10 individuals of *H. johannensis* and *H. paulistana*, 20 flowers collected from 10 individuals of *Hillia parasitica* (two flowers per individual), and 20 flowers collected from six individuals of *P. latifolia* (three or four flowers per individual) were observed.

Pollinators and pollination mechanisms

Observations of floral visitors were conducted between 18:00h and 04:00h in the four plant species. Nocturnal observations of pollinators were conducted using a flashlight covered with a red filter to minimize disturbance to visitors caused by illumination. To avoid any perturbation caused by light, we also used night-vision goggles to conduct nocturnal observations in complete darkness. Observations were made between the years 2009-2011 resulted in a total of 12 h of observation for *Habenaria johannensis* and *Hillia parasitica*, 30 h for *Posoqueria latifolia*, and 80 h for *Habenaria paulistana*. To make detailed observations of the mechanical interactions between flowers and pollinators (site of pollen/pollinaria attachment on the pollinators' bodies and deposition on stigmas), we manually fitted moths onto the flowers (in the case of the two orchids) and also inserted a slender grass stem into the corolla tube (in the case of the two Rubiaceae species) to simulate a hawkmoth proboscis.

In February of 2011, a flight cage was used to conduct observations on visits and pollinaria removal from *H. johannensis*. We set up a 2 m³ structure covered with nylon screen over a single flowering *H. johannensis* plant. Ten hawkmoths, representing five species, were released into the flight cage: two *Agrius cingulata* Fabricius (1775), one *Adhemarius eurysthenes* Felder (1874), two *Manduca diffissa* Butler (1871), two *M. florestan* Stoll (1782), two *M. brasiliensis* Rothschild & Jordan (1903), and one *Xylophanes ceratomioides* Grote & Robinson (1867). Moth activity was observed during three consecutive nights with the aid of night-vision goggles. More detailed observations were made regarding the function of pollination mechanisms of both *Habenaria* species by using captured moths from the study site.

To identify indirectly the plant visitors using pollen analyses, monthly collections of hawkmoths were carried out during the years 2008-2009. The moths were collected using a light-trap made from two white fabric sheets, 2.0 x 1.4 m, stretched and disposed at 180° and illuminated by two 250 W light bulbs (Philips ML 250 E27). Collection periods averaged 12 hours, beginning in the late afternoon and ending the following morning (see Amorim *et al.*, 2009). The pollen loads from the collected moths were treated using Erdtman acetolysis (Erdtman, 1960), pooled on a slide, and observed under light microscopy. To identify pollen loads, reference slides of *Hillia parasitica* and *Posoqueria latifolia* pollen grains were mounted using Erdtman acetolysis. Between November and December of 2010, 10 consecutive nights of collection were conducted to verify the presence of *Habenaria paulistana* pollinaria on moths captured in the light-trap. The same procedure was conducted during February of 2011 during six consecutive nights to verify the presence of *H. johannensis* pollinaria on captured moths.

Statistical Analysis

Differences in total milligrams of sugar produced by each species, as well as differences in the length of floral tubes between species were compared using one-way analysis of variance (ANOVA) and with a Turkey *post hoc* test for multiple comparisons among pairs of means (Zar 2010). Following Martins & Johnson (2007) we used simple linear regressions to test for the occurrence of sugar concentration gradients in nectar along the floral tubes.

RESULTS

Phenology

Flowering of the four hawkmoth-pollinated species was concentrated within the wettest months (October to March), although the highest peaks of flowering intensity for each species did not overlap, being separated by about a month (Fig. 2). With the exception of *Hillia parasitica*, the other species presented an annual flowering pattern (Fig. 2). *Hillia parasitica* displayed a subannual flowering pattern, characterized by more than one flowering peak during the year, but with one peak of higher intensity than others (Fig. 2). The two species of *Habenaria*, which have very similar floral displays, not only have non-overlapping spatial distributions, but also have non-overlapping flowering (Fig. 2).

Floral biology and breeding system

Flowers of all four species opened nocturnally, characterized by anther dehiscence, stigma receptivity and scent production. The beginning of floral anthesis in both orchid species was characterized by a viscous and shiny appearance of the stigmatic stalks surface and on the pair of viscidia. Anthesis in flowers of *Hillia parasitica* was indicated by anther dehiscence and production of a small drop of an adhesive exudate on the stigmatic surface, whereas anthesis in *Posoqueria latifolia* was characterized by anther dehiscence and stigma receptivity, as confirmed by reaction with a hydrogen peroxide solution (Kearns and Inouye, 1993). Duration of anthesis varied among the four species. Flowers of *Habenaria johannensis* and *H. paulistana* lasted up to seven days, whereas in *P. latifolia* and *Hillia parasitica* flowers lasted two and four nights, respectively. All species produced appealing and delicate odours throughout the night but peaked in intensity 2-3 hours following anthesis. Odours gradually ceased towards sunrise. Odours produced were sweet, with the exception of *H. johannensis*, which possessed a light odour of citrus.

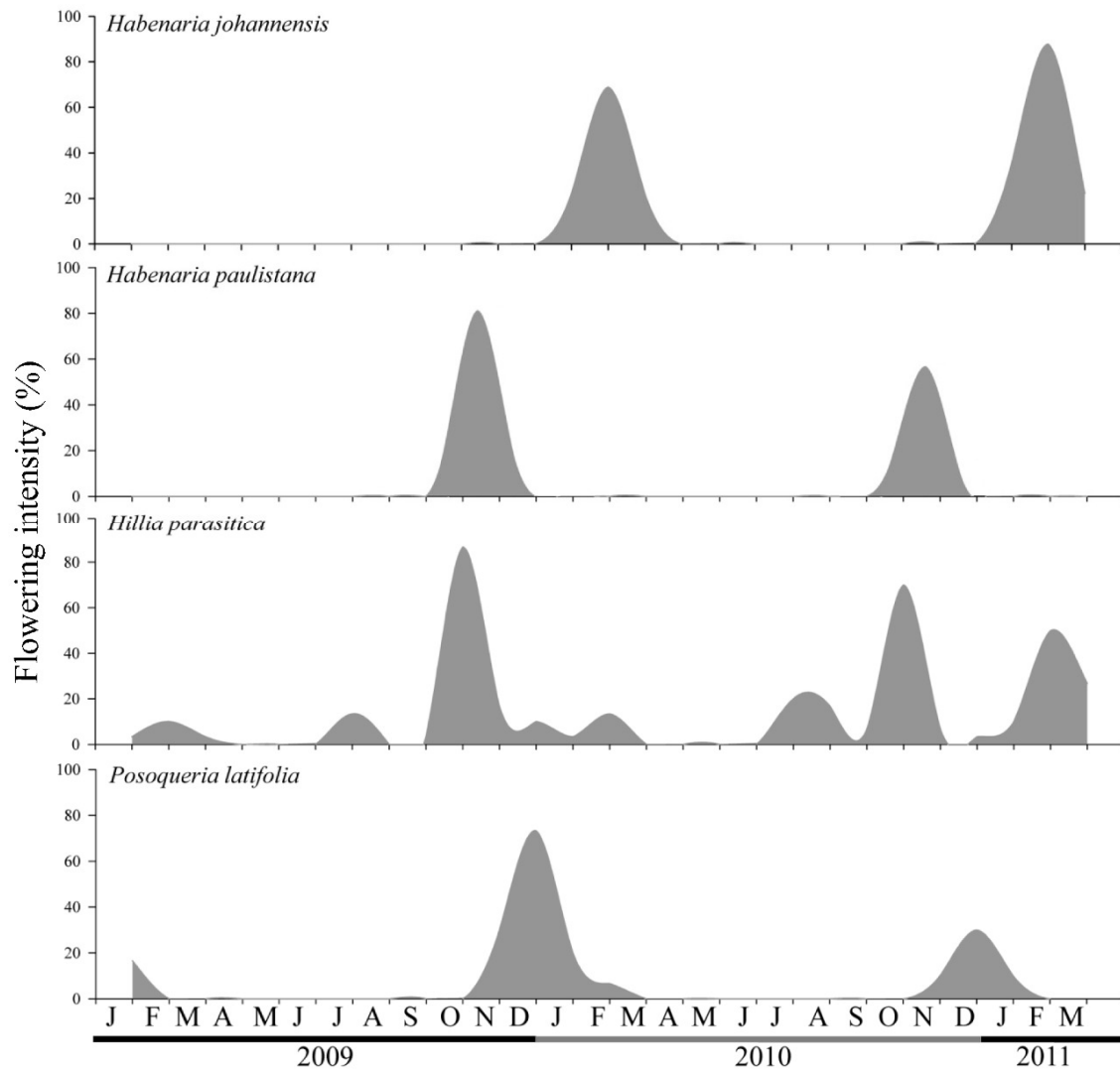


Figure 2. Flowering phenology of four hawkmoth-pollinated species in an area of Montane Ombrophilous Dense Forest in the Núcleo Santa Virgínia, Serra do Mar State Park, south-eastern Brazil. Flowering intensity is defined as the percentage of flowers produced per month in each population (for details, see methods).

Floral tube lengths differed significantly among the four species ($F_{3,370}=411.39$; $P<0.0001$), with only the difference between *Habenaria paulistana* and *P. latifolia* not reaching significance. *Hillia parasitica* had the shortest tubes (8.07 ± 1.20 cm, $n=68$), followed by *H. paulistana* (12.9 ± 1.20 cm, $n=63$), *P. latifolia* (13.0 ± 0.98 cm, $n=100$), and *H. johannensis* (13.8 ± 1.15 cm, $n=110$), which had the longest tubes. The greatest volume of nectar accumulated after 48 hours was $44.51\pm11.47\mu\text{l}$ in *Habenaria johannensis* (Table 1), which was significantly greater than for the other three species. The total amount of sugar was also significantly greater for this species ($F_{3,70}=8.06$; $P=0.0002$; Table 1). We tested for the occurrence of nectar sugar concentration gradients along floral tubes only in the two *Habenaria* species (Fig. 3). A significant increase in concentration of sugars in the direction of the nectary at the base of the spur was observed in both *H. johannensis* ($r^2=0.97$; $F_{1,5}=151.57$; $P=0.001$) and *H. paulistana* ($r^2=0.99$; $F_{1,4}=151.57$; $P=0.0001$) (Fig. 3). Similar patterns were not observed in *Hillia parasitica* or *P. latifolia*.

Table 1. Nectar measurements for four hawkmoth-pollinated species in an area of Montane Ombrophilous Dense Forest in the Núcleo Santa Virginia, Serra do Mar State Park, south-eastern Brazil. Twenty flowers were used for measurements after nectar accumulation during a 48h period. Different letters among the columns represent statistical differences among species.

Species	Nectar column (mm)	Volume (μl)	Concentration (%)	Sugars (mg)
<i>Habenaria johannensis</i>	47.06 ± 9.55	44.51 ± 11.47	14.59 ± 4.30	6.99 ± 2.97 a
<i>Habenaria paulistana</i>	34.87 ± 8.89	19.90 ± 5.37	19.15 ± 2.33	4.06 ± 1.15 b
<i>Hillia parasitica</i>	15.42 ± 3.60	31.25 ± 6.86	13.65 ± 2.03	4.50 ± 1.21 b
<i>Posoqueria latifolia</i>	20.29 ± 8.03	28.48 ± 14.20	15.30 ± 1.49	4.53 ± 2.03 b

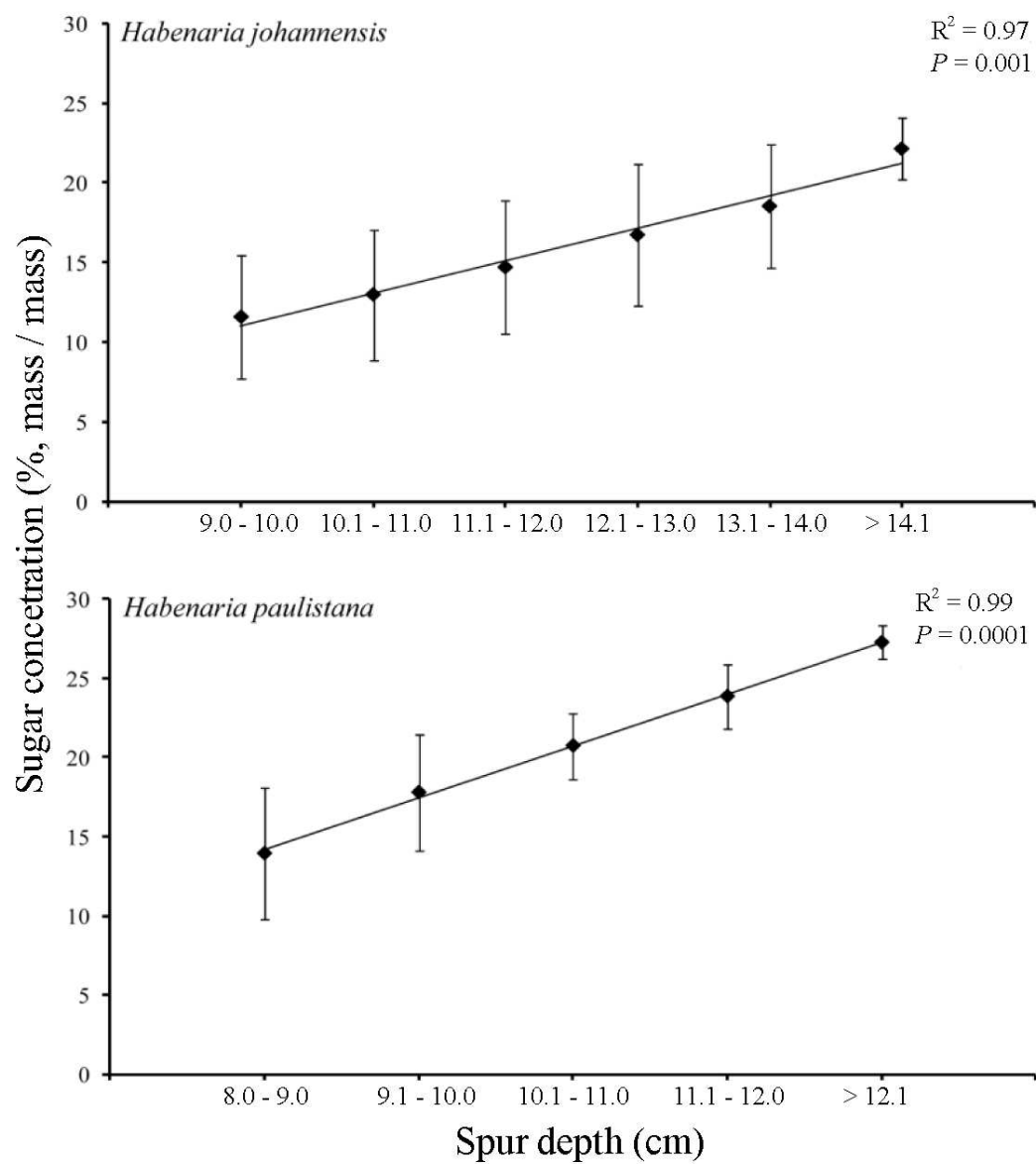


Figure 3. Sugar concentration gradient in nectar from two hawkmoth-pollinated orchid species in an area of Montane Ombrophilous Dense Forest of the Núcleo Santa Virgínia, Serra do Mar State Park, south-eastern Brazil. Black dots represent means, and bars extend one standard deviation above and below the mean.

The analysis of pollen tube growth after controlled pollinations (Fig. 4 A-D), suggest that the species are self-compatible, but strictly depend on pollinators for fruit-set, as no fruit developed by autonomous self-pollination in the absence of pollinators (Table 2). All species presented high ISI values ranging from 0.78 to 0.95. A comparison of rates of fruit-set resulting from cross-pollinations with those under natural conditions (control) indicated that all species suffer pollen limitation (Table 2).

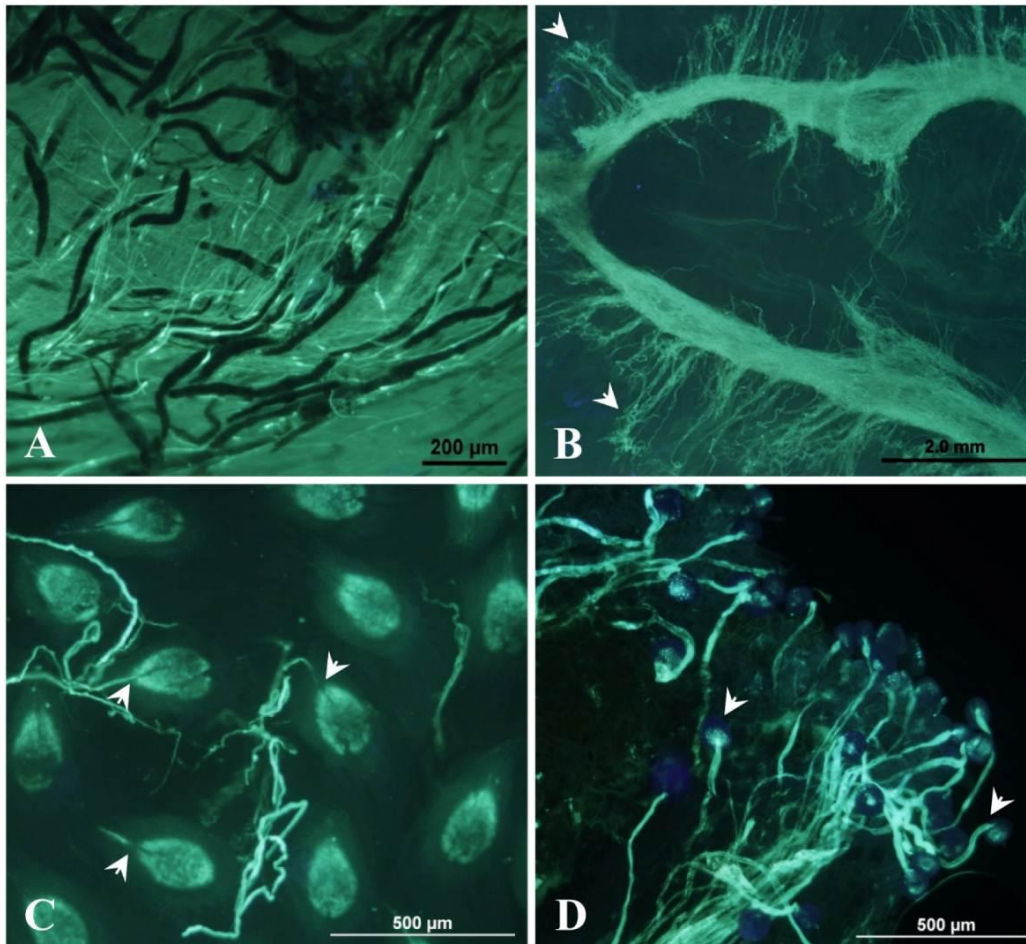


Figure 4. Pollen tubes resulting from manual self-pollinations in four hawkmoth-pollinated species in an area of Montane Ombrophilous Dense Forest in the Núcleo Santa Virgínia, Serra do Mar State Park, south-eastern Brazil. **A.** Pollen tubes on the stigma of *Habenaria johannensis*; **B.** Pollen tubes in the ovary of *Habenaria paulistana*. Note deviation from the main bundle of pollen tubes towards the ovules (arrows); **C.** Penetration of pollen tubes into the ovules (arrows) of *Hillia parasitica*; **D.** Stigmatic surface of *Posoqueria latifolia* with pollen grains germinating (arrows) and pollen tubes penetrating the stigma.

Table 2. Percentage of fruit-set after pollination treatments in four hawkmoth-pollinated species in an area of Montane Ombrophilous Dense Forest in the Núcleo Santa Virgínia, Serra do Mar State, south-eastern Brazil.

Treatments	% (Fruits / Flowers)			
	<i>Habenaria johannensis</i>	<i>Habenaria paulistana</i>	<i>Hillia parasitica</i>	<i>Posoqueria latifolia</i>
Cross-pollination	92.5 (37 / 40)	96.67 (58 / 60)	82.86 (29 / 35)	91.11 (41 / 45)
Manual self-pollination	72.5 (29 / 40)	81.67 (49 / 60)	65.71 (23 / 35)	86.67 (39 / 45)
Spontaneous self-pollination	0 (0 / 30)	0 (0 / 30)	0 (0 / 40)	0 (0 / 80)
Emasculation (agamospermy)	0 (0 / 50)	0 (0 / 60)	0 (0 / 40)	0 (0 / 120)
Control (natural conditions)	3.82 (36/942)	45.29 (385 / 850)	36.50 (23 / 63)	12.08 (43 / 356)
ISI	0.784	0.844	0.793	0.951

Pollinators and pollination mechanisms

Floral visits seem to be rare in all species. No visits were observed for *Habenaria johannensis* under field conditions, only under experimental conditions. During flight cage experiments conducted on *H. johannensis*, four visits were observed. Only two of the six species of hawkmoths placed in the flight cage visited flowers: *Agrius cingulata* and *Manduca brasiliensis* (two visits each). Only one of the two visits performed by *A. cingulata* resulted in effective pollinaria removal by the moth. In *H. paulistana* nine visits were recorded, mainly by *Manduca*. Despite the low number of visits observed in this orchid species, flowers were frequently observed with pollen massulae deposited on the stigmatic surface, thus indicating pollinator visitation under natural conditions (Fig. 5 C inset).

The two orchid species possess quite similar floral morphologies and pollination mechanisms (Fig. 5 A-D). In both species, a mechanical coupling between the hawkmoths' head and flower column is necessary to remove the hemipollinaria and deposit pollen massulae on the stigmatic surface (Fig. 5 D). These species differ, however, in relation to the specific site of hemipollinaria attachment onto the moths' head (Fig. 5 B, D). The rostellum of *Habenaria johannensis* is wider, has a greater inclination, and the rostellar arms are juxtaposed, positioning the viscidia upward at a greater angle than that of *H. paulistana* (Fig. 5 A, C). Such an arrangement causes the hemipollinaria to be attached to the hawkmoths' palps (Fig. 5 B). In *H. paulistana*, however, the rostellum is smaller and there is a greater

distance between the rostellar arms such that the hemipollinaria attach to the base of the hawkmoths' eyes (Fig. 5 D). Pollination occurs when the hanging hemipollinaria attached to the eyes or palps of the moths strikes the stigmas of subsequently visited flowers, thereby depositing pollen massulae on the highly sticky stigmatic surface (Fig. 5 C). Manual pollinations of both species indicated that a single hemipollinarium is sufficient for pollination of at least 10 flowers.

Two visits to *Hillia parasitica* by hawkmoths of the genus *Manduca* were recorded during our field observations. In this species anthers form a non-fused staminal tube surrounding the style, which creates a very narrow entrance to the corolla tube that is still wide enough to permit the hawkmoth's proboscis to be inserted through two adjacent anthers into the corolla (Fig. 5 E-F). The receptive stigma of *H. parasitica* produces a drop of an adhesive exudate that covers the fertile surface of the stigma (Fig. 5 E) and aids in adherence of pollen grains along the hawkmoth proboscis (Fig. 5 E). When a hawkmoth inserts its proboscis between the staminal tube and style to access the nectar at the base of the corolla tube, the pollen load is deposited on the stigmatic surface while the proboscis gets sticky from the adhesive stigmatic exudate (Fig. 5 F). Once the inserted proboscis is removed, the moth takes with it large numbers of pollen grains attached along the sticky proboscis. Nevertheless, the sterile region at the base of the stigma head prevents deposition of pollen on the same flower, avoiding self-pollination (Fig. 5 F-G).

In *Posoqueria latifolia* we recorded 23 hawkmoth visits, mainly by *A. cingulata* and *Manduca* spp. This species shows reverse herkogamy, a floral arrangement in which the stigma is recessed into the corolla tube and the anthers are positioned below the corolla entrance (Fig. 5 H). Moreover, anthers are laterally adhered to each other to form an ellipsoid structure (Fig. 5 H). Following flower opening, this ellipsoid structure of adhered anthers is positioned just below the entrance of the corolla tube, which is accessible to floral visitors (Fig. 5 H). Pollination in *P. latifolia* occurs through an explosive, catapult-like mechanism, by which the pollen masses of the once adhered anthers are flung against the ventral portion of the pollinator's proboscis. Only a slight pressure against the adhered anthers from a

proboscis or head of a visitor is sufficient to break the adhesion and trigger the pollen release mechanism. Upon release, the lateral pairs of anthers abruptly reposition to each side of the flower, at which time the middle anther, actuated by means of the filament, flings pollen against the mouthparts of the pollinator (Fig. 5 I). Following the visit, the middle filament blocks the entrance to the corolla tube, preventing further visitation during the same night (Fig. 5 I). At the end of the following day, the filament bends to reach a position below the corolla tube entrance, thereby unblocking it and allowing the flower to be revisited on the second or third night following anthesis (Fig. 5 J).

We captured in the light-traps a total of 578 hawkmoths, representing 50 species, of which only 94 (16%) individuals of 11 (22%) species possessed proboscises within the range of floral tube lengths of the four sphingophilous plants studied (Fig. 6). From this small group of long-tongued moths, 80% of the individuals and 90% of the species occurred during the wettest months (October to March). No hawkmoths were captured with orchid pollinaria attached to their heads. Pollen analyses revealed that only 16 individuals (2.8% of the total sampled) of 12 species carried pollen loads of *H. parasitica* (six species) and *P. latifolia* (seven species). From these moths, five individuals belonged to short-tongued species with proboscises ranging from 1.6 to 4.0 cm (Fig. 6). The greatest abundance of long-tongued hawkmoth species (proboscises > 5.0 cm) occurred from October to March (80% of 94 long-tongued moths sampled), during which the majority of species and individuals of the studied sphingophilous plants were blooming (Fig. 2).

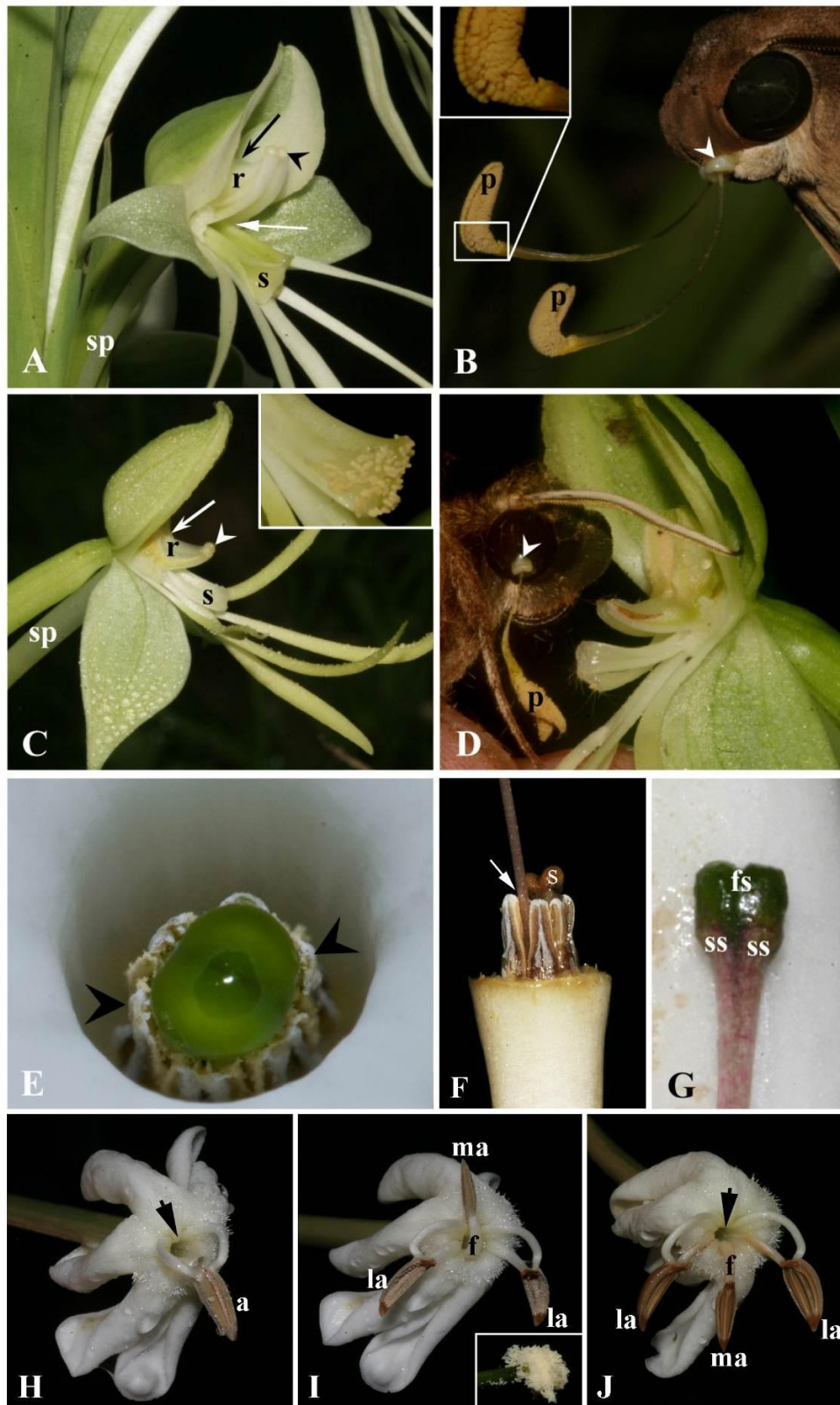


Figure 5. Pollination mechanisms in four hawkmoth-pollinated species in an area of Montane Ombrophilous Dense Forest in the Núcleo Santa Virgínia, Serra do Mar State Park, south-eastern Brazil. **A.** Flower of *Habenaria johannensis*; entrance to the spur (black arrow), position of the viscidia (arrowhead) in the rostellum (r), and the stigmatic arms (s) located immediately below. Note a possible second spur entrance (white arrow); **B.** Detail of the position of the hemipollinaria attached on the head of a hawkmoth, after manual fitting of the moth's head onto a fresh flower. Note the viscidium (arrowhead) attached to the labial palps of the moth, and the long caudicles with the hemipollinaria (p), which consists of dozens of pollen massulae (inset); **C.** *Habenaria paulistana* flower; the only entrance (arrow) to the spur (sp) and the position of the viscidia (arrowhead) on the rostellum (r) above the stigmatic arms (s). Detail of pollen massulae deposited on the stigma of a flower pollinated under natural conditions (inset); **D.** Viscidium attached, following manual fitting of the moth's head with the flower, to the base of the eyes (arrowhead), the long caudicle and the hemipollinarium (p). Note the position of the head in relation to the flower and the mechanical fit necessary for successful pollination; **E.** *Hillia parasitica* entrance of the corolla tube, showing the stigma surrounded by the anthers and the drop of stigmatic adhesive exudate covering the stigma surface (arrows); **F.** Longitudinal section of the corolla of *H. parasitica*, with the stigma (s) among the anthers, and a stipe simulating a hawkmoth proboscis introduced into the region where proboscises are habitually inserted (arrow); **G.** Stigmatic head of *H. parasitica*, details of the fertile (fs) and the sterile regions (ss); **H.** Entrance of the corolla tube (arrow) of a *Posoqueria latifolia* recently open flower, and the group of the laterally adhered anthers (a); **I.** Flower of *P. latifolia* after the catapult mechanism has been triggered, with two lateral anthers at each side (la) and the middle anther (ma) blocking the entrance to the floral tube with its filament (f). Note the single globose clump of released pollen (inset); **J.** Flower of *P. latifolia* 24 hours after pollen release showing that the lateral anthers (la) did not change position, but the filament (f) and the middle anther (ma) folded backward now permitting access to the corolla tube.

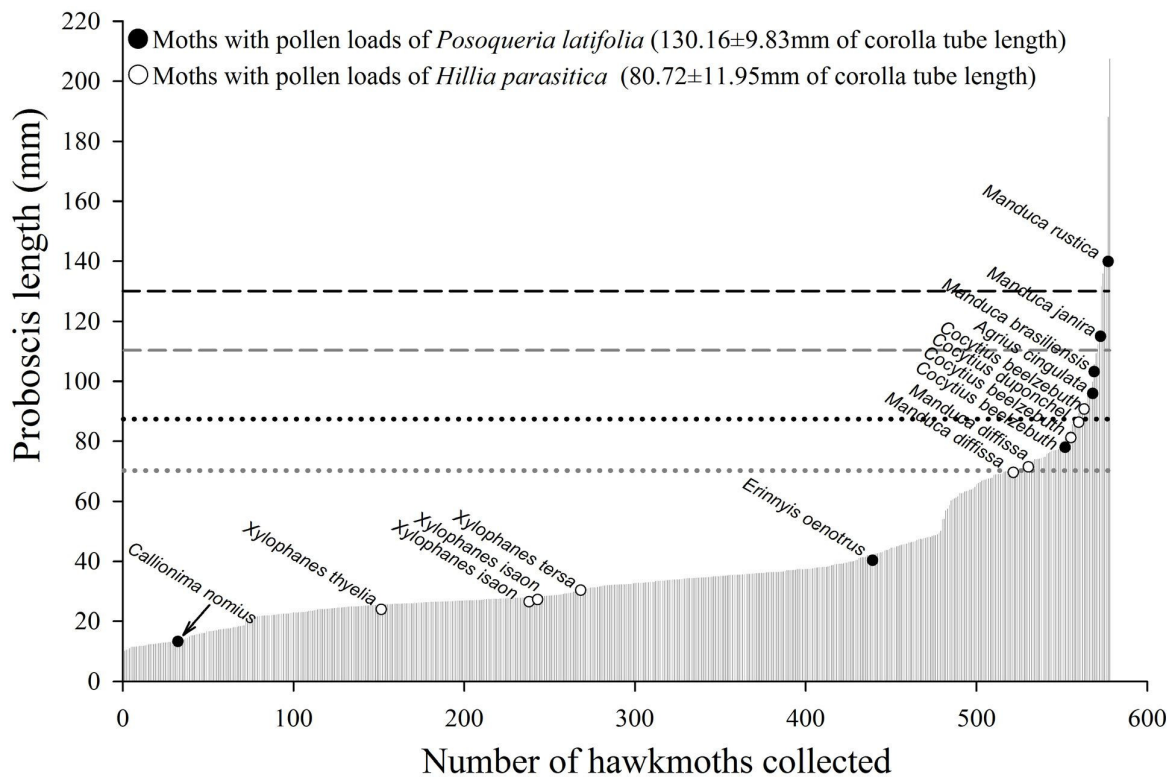


Figure 6. Distribution of the proboscis lengths of the 578 hawkmoths sampled in an area of Montane Ombrophilous Dense Forest in the Núcleo Santa Virgínia, Serra do Mar State Park, south-eastern Brazil and hawkmoths carrying pollen loads of *Hillia parasitica* (white circles) or *Posoqueria latifolia* (black circles). Black dashed line indicates the mean corolla tube length of *P. latifolia* and black dotted line the mean corolla tube length of *H. parasitica*. Grey lines (dashed represents *P. latifolia* and dotted *H. parasitica*) correspond to the corrected corolla tube lengths according to the mean height of the nectar column (shown in Table 1) within the floral tubes.

DISCUSSION

Phenology

The flowering phenology of the four hawkmoth-pollinated plants studied coincided with occurrence of long-tongued hawkmoths at the study site, despite their having non-overlapping peaks of flowering intensity. Pollinator limitation and competition for long-tongued pollinators may have led to these differences in flowering times. As observed in other areas, pollination of long-tubed plants

depends on availability of long-tongued hawkmoth species (Haber and Frankie, 1989; Nilsson *et al.*, 1987; Agosta and Janzen, 2005). Long-tongued hawkmoths (i.e. those with proboscises longer than 5.0 cm), however, are much less abundant than short-tongued moths and represent less than a third of all moths collected in our study area. These moths probably experience strong competition when exploiting nectar in short-tubed flowers, which allow access to the abundant short-tongued members of the hawkmoth assemblage (Rodríguez-Gironés and Santamaría, 2006; 2007; Rodríguez-Gironés and Llandres, 2008). In this sense there is an advantage for long-tongued hawkmoths to overlap their phenology with the flowering events of long-tubed flowers observed in the area of Atlantic Rainforest studied, because the overall amount of nectar produced by long-tubed flowers is higher than that produced by short-tubed flowers (see Haber & Frankie 1989, Amorim 2012), and because long-tubed flowers provide a sort of “private niche,” allowing nectar to be accessed only by the few long-tongued moths. Similar patterns have also been observed in other communities of hawkmoths and sphingophilous plants in the Costa Rican Dry Forest (Haber & Frankie 1989) and the Brazilian Cerrado in south-eastern Brazil (Amorim 2008).

On the various contrivances: floral biology and pollination mechanisms

While a wide variety of pollination mechanisms are already known (Darwin, 1862; Micheneau *et al.*, 2009; Barret, 2010), a new and intriguing mechanism has been recently discovered in a group of African aerangoid orchids (Martins and Johnson, 2007) and was recorded for second time in this study for Neotropical Habenariinae species. These plants present a gradient of sugar concentration along the nectar spurs that may function as a sugar trail to encourage their long-tongued pollinators to probe nectar deeply enough to reach the most concentrated nectar (Martin and Johnson, 2007). Darwin also noted in *Angraecum sesquipedale*, that in order to the pollination effectively occur “*the moth has to be compelled to drive its proboscis as deeply down as possible into the flowers*” (see Arditti *et al.* 2012). In this sense, the occurrence of nectar sugar gradients observed in distinct groups of orchids in East

Africa and South America may function as the compelling mechanism by which long-tongued hawkmoths contact their heads to the floral reproductive structures. Our findings suggest that the occurrence of a nectar sugar concentration gradient in spurs of hawkmoth-pollinated orchids may be more common and widespread than previously believed and may have evolved independently in diverse groups of hawkmoth-pollinated orchids.

For most *Habenaria* species whose pollination mechanisms have been studied, hemipollinaria attach to the eyes of the pollinator (Thien and Utech, 1970; Singer and Cocucci, 1997; Singer *et al.*, 2007), but in some cases pollinaria also attach to the proboscises (Singer, 2001) or legs (Peter *et al.*, 2009). *Habenaria paulistana* displayed a pollination mechanism similar to that of *H. gourlieana* in Argentina (Singer and Cocucci, 1997). Due to differences in rostellum morphology, however, *H. paulistana* viscidia commonly adhere to the posterior basal portion of the hawkmoth eye, whereas *H. gourlieana* viscidia adhere to the anterior portion (Singer and Cocucci, 1997). Through observing the general column morphologies (especially the form and position of the rostellar arms) of the Brazilian *Habenaria* species with the longest spurs (which are probably pollinated by hawkmoths: see Batista *et al.*, 2006), it is reasonable to assume that all species, with the exception of *H. johannensis*, attach hemipollinaria to the eyes of pollinators.

Singer *et al.* (2007) predicted that the peculiar morphology of the rostellum in *H. johannensis* would impede hemipollinaria attachment to the eyes, as commonly observed in other *Habenaria* species. We found hemipollinaria in *H. johannensis* attached to the hawkmoth labial palps, an uncommon place. Very few cases of palp-attachment pollinaria are known to occur in orchids (Nilsson 1983, Nilsson *et al.* 1987), one example being a hybrid between *Platanthera bifolia* (tongue-attachment) and *P. chlorantha* (eye-attachment). Viscidium adhesion to hairy parts of the pollinator body seems not to be as efficient as adhesion to smooth parts, such as tongues, eyes, and legs (Johnson and Edwards, 2000). Despite the fact that we did not collect any moth bearing hemipollinaria attached to their heads, the flight cage experiment with *H. johannensis* confirmed palp attachment of the

hemipollinaria previously observed by manually fitting the moth's head onto the floral column. Because of the curved or "boat" shape morphology of the *H. johannensis* rostellar arms, the space formed between the rostellum and the stigmatic arms may occasionally be used by flower visitors, as an alternative entrance to the spur. Using a dried moth with the proboscis uncoiled, we confirmed this second possibility. When the proboscis was inserted into this region, however, hemipollinaria were never removed. If flower visitors access nectar in this way in nature, they would act only as nectar thieves and not as pollinators.

Hillia parasitica presents a pollination mechanism in which pollen masses are attached to proboscises by means of an adhesive substance secreted by the stigma as in some Apocynaceae (Fallen, 1986; Darrault and Schlindwein, 2005; Moré *et al.*, 2007). In contrast to *H. parasitica*, however, in which an adhesive secretion is produced on the surface of the fertile stigma (Fig. 5 E), Apocynaceous species possess a specific secretory region separated from the fertile region where pollen is received (e.g. Darrault and Schlindwein, 2005; Moré *et al.*, 2007). In functional terms, both mechanisms aid in adherence of pollen grains along the hawkmoth proboscis. This pollination mechanism has not been previously described in *H. parasitica* or for other sphingophilous *Hillia* species (Vogel, 1969; Silberbauer-Gottsberger and Gottsberger, 1975; Taylor, 1994), and in the chiropterophilous *Hillia illustris* the mechanisms differ due to different flower morphology (Vogel 1969, Sazima *et al.* 1999). Pollen-adhesive substances are common in many plant families, including Cannaceae, Lamiaceae, Marcgraviaceae, and Orchidaceae (Glinos and Cocucci, 2011; Moyano *et al.*, 2003; Machado and Lopes, 2000; Endress, 1994). These substances are derived mainly from pollenkit, which is produced by anther tapetum and cover the pollen surface (Pacini and Hesse, 2005). In many cases, however, in which pollen is transported on smooth surfaces of the pollinator body, such as moth proboscises, the presence of stigmatic-accessory adhesive substances is important for effective pollen attachment (see Glinos and Cocucci, 2011 and references therein). Because this mechanism has not previously been described in the Rubiaceae, it would be worthwhile to investigate the occurrence of this adhesive

stigmatic secretion in other hawkmoth-pollinated species of *Hillia*, as well as to analyze the exudate origin and chemical composition.

The pollen catapult mechanism in *Posoqueria latifolia* was first described by Müller (1866) and subsequently observed by Hallé (1967), Puff *et al.* (1995) and Delprete (2009). Despite many studies of this pollination mechanism, however, there are still controversies about the compatibility system, the occurrence of protandry and the mode of pollen release. *Posoqueria latifolia* was classified as self-incompatible and distylous by Beach (1983) and in Bawa *et al.* (1985). We could find no evidence, however, of heterostyly in *P. latifolia*, and it is unknown in the tribe Posoquerieae (Delprete 2009). Similarly, we could find no evidence of self-incompatibility, as our self-pollinations resulted in 86% fruit-set, nearly as high as for cross-pollinations. Our results show that *P. latifolia* is a monomorphic self-compatible species.

Many *Posoqueria* species are protandrous, and stylar elongation growth follows anther maturation and pollen release (Delprete 2009), but *P. latifolia* have a recessed stigma and there is no change in the style length after anther maturation. The occurrence of physiological dichogamy, due to sequential maturation of both sexual functions, noted by Beach (1983) and Delprete (2009), cannot be confirmed by our study. Instead, our observations revealed that the stigma was functionally active during the first night of anthesis, concomitant with anther maturation. Tests with hydrogen peroxide yielded a positive reaction, and flowers manually pollinated during the first night of anthesis showed normal pollen tube growth 12h after pollination. Hence, dichogamy in *P. latifolia* is effected solely by a mechanical block of the corolla tube entrance by the middle filament once the catapult mechanism is triggered, preventing further visitation during the same night. Consequently, if a flower is not pollinated on the first visit, it achieves only male function. Female function can be achieved only during the following nights, when the corolla tube becomes unblocked, allowing the flower to be revisited.

Hallé (1967) found that pollen release by the catapult mechanism resulted in a single globose clump of pollen, but Puff *et al.* (1995) and Delprete (2009) observed that pollen release occurred in many small clumps. We observed both modes of pollen release in different flowers of a single plant, independent of flower age (see video in Supplementary information). But even when pollen was released in a single clump, this clump could easily break into many smaller clumps, which might facilitate pollen masses spreading along the hawkmoth proboscis when recoiled (Fig. 1 in Supplementary information). Pollen spreading along the proboscis is essential for pollination to occur in *P. latifolia*, as the stigma is recessed in the corolla tube. The presence of reverse herkogamy is associated mainly with long and narrow tubed flowers pollinated by hawkmoths (Webb and Lloyd, 1986, Kulbaba and Worley, 2012). Such a floral arrangement seems to promote efficient pollen receipt and is maintained by long-tongued pollinators through female, rather than male, flower function in hawkmoth-pollinated flowers (Kulbaba & Worley 2012).

Breeding systems and pollinator limitation

Hand cross-pollinations significantly increased fruit-set in the four studied species, indicating that fruit-set is highly limited by pollinator activity. Limited pollinator activity was also recorded for a bee-pollinated species in the NSV (Brito & Sazima, 2012). Pollinator limitation, however, seems to be widespread in hawkmoth-pollinated species (e.g. Herrera, 1990; Moody-Weis and Heywood, 2001; Oliveira *et al.*, 2004; Darrault and Schlindwein, 2005). In some cases, long-tongued hawkmoths are virtually absent from the community, and pollination of long-tubed flowers is related to opportunist flower visitors, such as bees (Huang and Fenster, 2007; Zhang *et al.*, 2011). Consequently, selection may favour the evolution of self-compatibility in such pollinator-limited species, in order to assure sexual reproduction, as selfing may reduce reliance on pollinators (Baker, 1955; Fausto *et al.*, 2001; Moeller, 2006).

Hawkmoth assemblages are prone to spatiotemporal fluctuations in species composition (Janzen, 1986; 1987; Amorim *et al.*, 2009). These fluctuations can result in very unreliable pollination, especially in highly specialized long-tubed plants that depend on less abundant long-tongued hawkmoths for pollination, limiting their reproductive success. Additionally, phenotypic selection analyses of the two *Habenaria* species studied here revealed the absence of significant pollinator-mediated selection gradients on spur length of both species, due to mismatches in plant-pollinator traits (Moré *et al.*, 2012). Plant-pollinator trait mismatches were also observed in *H. parasitica* and *P. latifolia*, since very few of the recorded flower visitors, possess proboscises in equal size or longer than the mean corolla tube length of both species. The short-tongued moths recorded with pollen load of these species, however, did not have access to nectar (Fig. 6). Such trait mismatches seem to be highly correlated with pollinator-dependent plants, however, as these plants normally have more exaggerated morphological traits than do pollinators (Anderson *et al.*, 2010).

Final remarks

Long-tongued hawkmoths are long-lived insects with the capacity for long-range flight, wide home ranges, but low abundance in relation to their short-tongued counterparts. Our pollen analyses revealed that some pollinators of the plants analysed in this study, such as *Agrius cingulata* and *Manduca rustica* were also carrying pollen loads of *Tocoyena bullata* (Vell.) Mart. (Rubiaceae), a species with very long corollas (*ca.* 13 cm) that is restricted to the coastal Restinga vegetation in the lowland forest, at least 15 km away from the collection site. The lowland Atlantic Rainforest forms a continuous forest with the highland forest at NSV along an altitudinal gradient of *ca.* 1,000 m in the Serra do Mar State Park, allowing hawkmoths to freely travel between different forest formations, visiting many species with long-tubed flowers in those areas. Hence, habitat degradation could affect hawkmoth activities and increases pollinator-limitation in hawkmoth-pollinated plants (Moody-Weis and Heywood, 2001). In this sense, conservation of the ecosystem's functional diversity, as well as

sexual reproduction of endemic species such *Habenaria paulistana* and other long-tubed species, depends critically on the pollination service of less abundant long-tongued hawkmoths, which in turn, depend on conservation of this critically threatened biome (Myers *et al.*, 2000; Ribeiro *et al.*, 2009).

REFERENCES

- Agosta SJ, Janzen DH.** 2005. Body size distributions of large Costa Rican dry forest moths and the underlying relationship between plant and pollinator morphology. *Oikos* **108**: 183–193.
- Altshuler DL, Clark CJ.** 2003. Darwin's Hummingbirds. *Science* **300**: 588–589.
- Amorim, FW.** 2008. *A comunidade de esfingídeos (Lepidoptera, Sphingidae) e plantas esfingófilas numa área de Cerrado no sudeste do Brasil: biogeografia e associações mutualísticas*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG.
- Amorim FW, Avila Jr. RS, Camargo JA, Vieira A, Oliveira PE.** 2009. A hawkmoth crossroads? Species richness, seasonality and biogeographical affinities of Sphingidae in a Brazilian Cerrado. *Journal of Biogeography* **36**: 662–674.
- Anderson B, Johnson SD.** 2008. The geographical mosaic of coevolution in a plant-pollinator mutualism. *Evolution* **62**: 220–225.
- Anderson B, Terblanche JS, Ellis AG.** 2010. Predictable patterns of trait mismatches between interacting plants and insects. *BMC Evolutionary Biology* **10**: 204.
- Baker HG.** 1955. Self-compatibility and establishment after “longdistance” dispersal. *Evolution* **9**: 347–349.
- Barrett SCH.** 2010. Darwin's legacy: the forms, function and sexual diversity of flowers. *Philosophical Transactions of Royal Society B* **365**: 351–368.
- Batista JAN, Bianchetti LB, Miranda ZJ.** 2006. A revision of *Habenaria* section *Macroceratitae* (Orchidaceae) in Brazil. *Brittonia* **58**: 10–41.

- Bawa KS, Bullock SH, Perry DR, Coville RE, Grayum MH.** 1985. Reproductive biology of tropical lowland rain forest II. Pollination systems. *American Journal of Botany* **72**: 346–356.
- Beach J.** 1983. *Posoqueria latifolia* (Boca de Vieja, Guayaba de Mico, Fruta de Mono). In: Janzen DH, ed. *Costa Rican Natural History*. University of Chicago Press, Chicago, 307–308
- Bullock SH.** 1985. Breeding systems in the flora of a tropical deciduous forest in Mexico. *Biotropica* **17**: 287–301.
- Darrault RO, Schlindwein C.** 2002. Esfingídeos (Lepidoptera, Sphingidae) no Tabuleiro Paraibano, nordeste do Brasil: abundância, riqueza e relação com plantas esfingófilas. *Revista Brasileira de Zoologia* **19**: 429–443.
- Darrault RO, Schlindwein C.** 2005. Limited fruit production in *Hancornia speciosa* (Apocynaceae) and pollination by nocturnal and diurnal insects with long mouth parts. *Biotropica* **37**: 381–388.
- Darwin C.** 1862. *On the various contrivances by which British and foreign orchids are fertilised by insects and on the good effects of intercrossings*. New York: D. Appleton.
- Delprete PG.** 2009. Taxonomic history, morphology, and reproductive biology of the tribe Posoquerieae (Rubiaceae, Ixoroideae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* **96**: 79–89.
- Dressler RL.** 1993. *Phylogeny and classification of the orchid family*. Dioscorides Press, Portland.
- Endress PK.** 1994. *Diversity and evolutionary biology of tropical flowers*. Cambridge: Cambridge Univ Press.
- Erdtman G.** 1960. The acetolysis method. A revised description. *Svensk Botanisk Tidskrift* **54**: 561–564.
- Fallen ME.** 1986. Floral structure in the Apocynaceae: Morphological, functional, and evolutionary aspects. *Botanische Jahrbücher für Systematik* **106**: 245–286.
- Fausto JA, Eckhart VM, Geber MA.** 2001. Reproductive assurance and the evolutionary ecology of self-pollination in *Clarkia xantiana* (Onagraceae). *American Journal of Botany* **88**: 1794–1800.
- Friedman WE.** 2009. The meaning of Darwin's "abominable mystery." *American Journal of Botany* **96**: 5–21.

- Galetto L, Bernardello G.** 2005. Nectar. In: Dafni A, Kevan P, eds. *Pollination ecology: a practical approach*. Cambridge, Canada, 156–212.
- Glinos E, Cocucci AA.** 2011. Pollination biology of *Canna indica* (Cannaceae) with particular reference to the functional morphology of the style. *Plant Systematics and Evolution* **291**: 49–58.
- Gómez JM, Perfectti F.** 2010. Evolution of complex traits: the case of *Erysimum* corolla shape. *International Journal of Plant Sciences* **171**: 987–998.
- Haber WA, Frankie GW.** 1989. A tropical hawkmoth community: Costa Rican dry forest Sphingidae. *Biotropica* **21**: 155–172.
- Hallé F.** 1967. Étude biologique et morphologique de la tribu des Gardeniées (Rubiaceées). *Mémoire ORSTOM* **22**: 1–146.
- Herrera, CM.** 1990. The adaptedness of the floral phenotype in a relict endemic, hawkmoth-pollinated violet. 1. Patterns of variation among disjunct populations. *Biological Journal of the Linnean Society* **40**: 275–291.
- Hodges SA, Whittall JB.** 2008. Floral evolution: One-sided evolution or two? A reply to Ennos. *Heredity*, **100**: 541–542.
- Huang S-Q, Fenster CB.** 2007. Absence of long-tongued pollinators for long corolla-tube Himalayan *Pedicularis* species: implications for the evolution of corolla length. *International Journal of Plant Sciences* **168**, 325–331.
- Janzen DH.** 1986. Biogeography of an unexceptional place: what determines the saturniid and sphingid moth fauna of Santa Rosa National Park, Costa Rica, and what does it mean to conservation biology? *Brenesia* **25/26**: 51– 87.
- Janzen DH.** 1987. How moths pass the dry season in a Costa Rican dry forest. *Insect Science and its Applications* **8**: 489–500.
- Johnson SD, Edwards TJ.** 2000. The structure and function of orchid pollinaria. *Plant Systematics and Evolution* **222**: 243–269.
- Johnson SD.** 2010. The pollination niche and its role in the diversification and maintenance of the Southern African flora. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* **365**: 499–516.
- Kearns CA, Inouye DW.** 1993. *Techniques for pollination biologists*. University Press of Colorado, Niwot, Colorado.

- Kislev ME, Kravitz Z, Lorch J.** 1972. A study of hawkmoth pollination by a palinological analysis of the proboscis. *Israel Journal of Botany*, **21**: 57–75.
- Kramer EM, Hodges SA.** 2010. *Aquilegia* as a model system for the evolution and ecology of petals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* **365**: 477–490.
- Kulbaba, MW, Worley AC.** 2012. Selection on floral design in *Polemonium brandegeei* (Polemoniaceae): female and male fitness under hawkmoth pollination. *Evolution* **66**: 1344–1359.
- Lunau K.** 2004. Adaptive radiation and coevolution - pollination biology case studies. *Organisms, Diversity & Evolution* **4**: 207–224.
- Machado IC, Lopes AV.** 2000. *Souroubea guianensis* Aubl.: quest for its legitimate pollinator and the first record of tapetal oil in the Marcgraviaceae. *Annals of Botany* **85**: 705–711.
- Martin, FW.** 1959. Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. *Stain Technology* **34**: 125–128.
- Martins DJ, Johnson SD.** 2007. Hawkmoth pollination of aerangoid orchids in Kenya, with special reference to nectar sugar concentration gradients in the floral spurs. *American Journal of Botany* **94**: 650–659.
- Micheneau C, Johnson SD, Fay MF.** 2009. Orchid pollination: from Darwin to the present day. *Botanical Journal of the Linnean Society* **161**: 1–19.
- Moeller DA.** 2006. Geographic structure of pollinator communities, reproductive assurance, and the evolution of self-pollination. *Ecology*, **87**: 1510–1522.
- Moody-Weis JM, Heywood JS.** 2001. Pollination limitation to reproductive success in the Missouri evening primrose, *Oenothera macrocarpa* (Onagraceae). *American Journal of Botany* **88**: 1615–1622.
- Moré M, Sérsic AN, Cocucci AA.** 2007. Restriction of pollinator assemblage through flower length and width in three long-tongued hawkmoth-pollinated species of *Mandevilla* (Apocynaceae, Apocynoideae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* **94**: 487–506.

- Moré M, Amorim FW, Benitez-Vieyra S, Medina AM, Sazima, M, Cocucci A.A.** 2012. Armament imbalances: Match and mismatch in plant-pollinator traits of highly specialized long-spurred orchids. *PLoS ONE* (In press – anexo 1).
- Moyano F, Cocucci AA, Sérscie A.** 2003. Accessory pollen adhesive from glandular trichomes on the anthers of *Leonurus sibiricus* (Lamiaceae). *Plant Biology* **5**: 411–418.
- Müller F.** 1866. Über die Befruchtung der *Martha* (*Posoqueria*?) *fragrans*. *Botanisch Zeitung* **23**: 129–133.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GAB, Kent J.** 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* **403**: 853–858.
- Newstrom LE, Frankie GW, Baker HG.** 1994. A new classification for plant phenology based on flowering patterns in Lowland Tropical Rain Forest Trees at La Selva, Costa Rica. *Biotropica* **26**: 141–159.
- Nilsson LA.** 1983. Processes of isolation and introgressive interplay between *Platanthera bifolia* (L.) Rich and *P. chlorantha* (Custer) Reichb. (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **87**: 325–350.
- Nilsson LA.** 1988. The evolution of flowers with deep corolla tubes. *Nature* **334**: 147–149.
- Nilsson LA, Jonsson L, Ralison L, Randrianjohany E.** 1987. Angraecoid orchids and hawkmoths in central Madagascar: specialized pollination systems and generalist foragers. *Biotropica* **19**: 310–318.
- Oliveira PE, Gibbs PE.** 2000. Reproductive biology of wood plants in a Cerrado community of central Brazil. *Flora* **195**: 311–329.
- Oliveira PE, Gibbs PE, Barbosa AA.** 2004. Moth pollination of woody species in the Cerrados of Central Brazil: a case of so much owed to so few? *Plant Systematics and Evolution* **245**: 41–54.

- Ollerton J, Alarcón R, Waser NW, Price MA, Watts S, Cranmer L, Hingston A, Peter CI, Rotenberry J.** 2009 A global test of the pollination syndrome hypothesis. *Annals of Botany* **103**: 1471-1480.
- Pacini E, Franchi GG, Hesse M.** 1985. The tapetum: its form, function, and possible phylogeny in *Embryophyta*. *Plant Systematics and Evolution* **149**: 155–185.
- Pauw A, Stofberg J, Waterman RJ.** 2009. Flies and flowers in Darwin's race. *Evolution* **63**: 268–279.
- Puff CAI, Buchner R, Rohrhofer U.** 1995. The united stamens of Rubiaceae. Morphology, anatomy; their role in pollination ecology. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **82**: 357–382.
- Ribeiro MC, Metzger JP, Martensen AC, Ponzoni FJ, Hirota MM.** 2009. Brazilian Atlantic forest: how much is left and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation* **142**: 1141–1153.
- Rodríguez-Gironés MA, Llandres AL.** 2008. Resource competition triggers the co-evolution of long tongues and deep corolla tubes. *PLoS ONE* **3**: e2992.
- Rodríguez-Gironés MA, Santamaría L.** 2006. Models of optimal foraging and resource partitioning: deep corollas for long tongues. *Behavioral Ecology* **17**: 905–910.
- Rodríguez-Gironés MA, Santamaría L.** 2007. Resource competition, character displacement, and the evolution of deep corolla tubes. *American Naturalist* **170**: 455–464.
- Setzer J.** 1966. *Atlas climatológico do estado de São Paulo*. Comissão Interestadual da Bacia do Paraná-Paraguai. CESP, São Paulo.
- Silberbauer-Gottsberger I, Gottsberger G.** 1975. Über sphingophile Angiospermen brasiliens. *Plant Systematic and Evolution* **123**: 157–184.
- Singer RB, Cocucci AA.** 1997. Eye attached hemipollinaria in the hawkmoth and settling moth pollination of *Habenaria* (Orchidaceae): A study on functional morphology in 5 species from subtropical South America. *Botanica Acta* **110**: 328–337.

- Singer RB.** 2001. Pollination biology of *Habenaria parviflora* (Orchidaceae: Habenariinae) in Southeastern Brazil. *Darwiniana* **39**: 201–207.
- Singer RB, Breier TB, Flach A, Farias-Singer R.** 2007. The pollination mechanism of *Habenaria pleiophylla* Hoehne & Schlechter (Orchidaceae: Orchidinae). *Functional Ecosystems and Communities* **1**: 10–14.
- Stebbins GL.** 1970. Adaptive radiation of reproductive characteristics in angiosperms, I: pollination mechanisms. *Annual Review of Ecology and Systematics* **1**: 307–326.
- Taylor CM.** 1994. Revision of *Hillia* (Rubiaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* **81**: 571–609.
- Temeles EJ, Kress WJ.** 2003. Adaptation in a plant-hummingbird association. *Science* **300**: 630–633.
- Thien LB, Utech F.** 1970. The Mode of Pollination in *Habenaria obtusata* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* **57**: 1031–1035.
- Tripp EA, Manos PS.** 2008. Is floral specialization an evolutionary dead-end? Pollination system transitions in *Ruellia* (Acanthaceae). *Evolution* **62**: 1712–1737.
- Veloso HP, Rangel-Filho ALR, Lima JCA.** 1991. *Classificação da Vegetação Brasileira, Adaptada a um Sistema Universal*. IBGE, Departamento de Recursos Naturais e Estudos Ambientais.
- Vogel S.** 1969. Chiropterophilie in der neotropischen Flora. II. *Flora* **158**: 185–350.
- Waser NM, Chittka L, Price MV, Williams NM, Ollerton J.** 1996. Generalization in pollinations systems, and why it matters. *Ecology* **77**, 1043–1060.
- Wasserthal LT.** 1997. The pollinators of the Malagasy star orchids *Angraecum sesquipedale*, *A. sororium* and *A. compactum* and the evolution of extremely long spurs by pollinator shift. *Botanica Acta* **110**: 343–359.
- Webb CJ, Lloyd DG.** 1986. The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigmas in angiosperms. II. Herkogamy. *New Zealand Journal of Botany*, **24**: 163–178.

Whittall JB, Hodges SA. 2007. Pollinator shifts drive increasingly long nectar spurs in columbine flowers. *Nature* **447**: 706–710.

Zar JH. 2010. *Biostatistical Analysis*. 5th Edition. Prentice Hall, New Jersey, EUA.

Zhang Z-Q, Kress WJ, Xie W-J, Ren P-Y, Gao J-Y, Li Q-J. 2011. Reproductive biology of two Himalayan alpine gingers (*Roscoeia* spp., Zingiberaceae) in China: pollination syndrome and compensatory floral mechanisms. *Plant Biology* **13**: 582–589.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Video: <http://www.youtube.com/watch?v=UTfrPN66H1M&feature=youtu.be>

Figure:



Figure 1S. *Manduca rustica* collected at Núcleo Santa Virgínia in January 2009 carrying many small clumps of *Posoqueria latifolia* pollen. Note the pollen clumps spread along the moth's proboscis (115.96 mm).

CAPÍTULO IV

OPEN ACCESS Freely available online



Armament Imbalances: Match and Mismatch in Plant-Pollinator Traits of Highly Specialized Long-Spurred Orchids

Marcela Moré¹, Felipe W. Amorim^{2*}, Santiago Benitez-Vieyra¹, A. Martin Medina¹, Marlies Sazima³, Andrea A. Cocucci¹

¹ Laboratorio de Ecología Evolutiva y Biología Floral, Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas - Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina, ² Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Departamento de Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil, ³ Departamento de Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil

Abstract

Background: Some species of long-spurred orchids achieve pollination by a close association with long-tongued hawkmoths. Among them, several *Habenaria* species present specialized mechanisms, where pollination success depends on the attachment of pollinaria onto the heads of hawkmoths with very long proboscises. However, in the Neotropical region such moths are less abundant than their shorter-tongued relatives and are also prone to population fluctuations. Both factors may give rise to differences in pollinator-mediated selection on floral traits through time and space.

Methodology/Principal Findings: We characterized hawkmoth assemblages and estimated phenotypic selection gradients on orchid spur lengths in populations of three South American *Habenaria* species. We examined the match between hawkmoth proboscis and flower spur lengths to determine whether pollinators may act as selective agents on flower morphology. We found significant directional selection on spur length only in *Habenaria gourlieana*, where most pollinators had proboscises longer than the mean of orchid spur length.

Conclusions/Significance: Phenotypic selection is dependent on the mutual match between pollinator and flower morphologies. However, our findings indicate that pollinator-mediated selection may vary through time and space according to local variations in pollinator assemblages.

Citation: Moré M, Amorim FW, Benitez-Vieyra S, Medina AM, Sazima M, et al. (2012) Armament Imbalances: Match and Mismatch in Plant-Pollinator Traits of Highly Specialized Long-Spurred Orchids. PLoS ONE 7(7): e41878. doi:10.1371/journal.pone.0041878

Editor: Martin Heil, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Mexico

Received: February 20, 2012; **Accepted:** June 27, 2012; **Published:** July 25, 2012

Copyright: © 2012 Moré et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was supported by Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) [PIP # 11220080101264 to Alicia Sérsic and MM], MINCYT [PID # 31 to AAC and SBV] and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) as part of the Thematic Project Functional Gradient [03/12595-7], within the BIOTA/FAPESP Program – The Biodiversity Virtual Institute (<http://www.biota.org.br>), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) [Grant 302452/2008-7 to MS]. This study is part of FWA's PhD supported by FAPESP [grant 2007/58666-3]. MM, SBV and AAC are staff researchers of CONICET. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: amorimfelipe@yahoo.com.br

INTRODUCTION

One of the most important aspects in the study of floral evolution is to evaluate the role that pollinators play in moulding flower form (Darwin 1862, Stebbins 1970, Endress 1994, Johnson & Steiner 2000). This issue acquires particular relevance in the case of plants pollinated by long-tongued hawkmoths where a mutual matching between proboscis and flower lengths is necessary for successful pollination (Darwin 1877, Nilsson *et al.* 1987, Anderson *et al.* 2010). This system was first pointed out by Darwin (1862) to exemplify the mechanism of a coevolutionary race, in which hawkmoth proboscis length and nectar spur length might act as selective agents for each other, in which adaptive peaks are constantly and gradually increasing (Pauw *et al.* 2009).

Long-tongued hawkmoths have an advantage in terms of nectar intake because they can access a broader range of flower corolla lengths than short-tongued individuals, and so, these hawkmoths are released from the level of competition experienced by small- and modal-tongued individuals (Agosta & Janzen 2005). Similarly, long flowers have an advantage over short ones, because they benefit from an increase in pollination effectiveness through improved contact between flower and pollinator. Furthermore, if long-tongued hawkmoths reject shorter flowers because long flowers provide higher energetic rewards, long flowers are likely to benefit from an increase of pollinator quality and quantity (Agosta & Janzen 2005). Thus, spurs longer than moths' proboscises are positively selected up to some critical point where the nectar becomes inaccessible to the moths and pollinator-mediate selection becomes stabilizing (Agosta & Janzen 2005, Anderson *et al.* 2010). In addition to this paired coevolutionary scenario, two alternative hypotheses that take into account community aspects have been proposed: the pollinator shift model, which posits a punctuated evolution of spur length due to a switch to new pollinators with longer tongues (Wasserthal 1997, Whittall & Hodges 2007), and the optimal foraging model (Rodríguez-Gironés & Santamaría 2006, Rodríguez-Gironés & Santamaría 2007, Rodríguez-Gironés & Llandres 2008), where the foraging strategy of pollinators triggers the

coevolution of long proboscises and deep corolla tubes. Moreover, at a larger temporal and spatial scale (e.g. the Neotropics), it has been proposed that the mechanism behind spur and proboscis elongation is one of diffuse evolutionary interactions among plants and pollinators that generate and maintain general trends in space and time (Agosta & Janzen 2005).

Natural selection driven by pollinators may modify the distribution of one or more floral traits within a population, particularly those associated with the precise functioning of the pollination mechanism (Alexandersson & Johnson 2002, Maad & Alexandersson 2004, Benitez-Vieyra *et al.* 2006). These traits are expected to be subject to directional (Alexandersson & Johnson 2002, Nilsson 1988, Robertson & Wyatt 1990, Steiner & Whitehead 1990, Johnson & Steiner 1997, Maad 200) or (once the optimum is achieved) stabilizing selection (Creswell 1998, Kingsolver & Pfennig 2007). These expectations presume that pollinator mouthparts are equal or longer than the floral tube length. However, mismatches may occur due to spatio-temporal fluctuations in pollinator assemblages (Hegland *et al.* 2009). Hence, long-tongued pollinators, those capable to reach hidden nectar in extremely deep flower tubes, may be unreliable pollinators across time and space (Zhang *et al.* 2011).

Hawkmoth assemblages in the Neotropical region consist mainly of short-tongued species that are more abundant than their few long-tongued counterparts (Haber & Frankie 1989, Darrault & Schlindwein 2002, Agosta & Janzen 2005, Duarte Jr. & Schlindwein 2005, Moré *et al.* 2005, Amorim *et al.* 2009). Since pollination of long-spurred species is highly dependent on these less abundant hawkmoths, we would expect marked variation in their reproductive success according to spatio-temporal differences in the pollinator assemblages. Moreover, stabilizing or positive directional patterns of pollinator-mediated phenotypic selection may only take place when the hawkmoth tongue lengths equal or exceed the average of the spur length in a plant population. Consequently, populations of extremely long-spurred orchids offer a model system to test these expectations on selection patterns.

Although the relationships between hawkmoths and orchids have been used as a classical model for studies on flower evolution (Nilsson 1988, Alexandersson & Johnson 2002, Whittall & Hodges

2007), no studies on pollinator-mediated selection have addressed this subject in orchids with extremely long floral tubes. In this context, the aim of this study was to analyse the occurrence of pollinator-mediated selection in long-spurred South American orchids. We surveyed the hawkmoth faunas in a Montane Grassland area in Central Argentina and in a Montane Atlantic Rainforest area in Southeastern Brazil, and we analyzed the match of tongue and spur lengths distributions to address whether pollinators may act as selective agents on flower morphology. We also investigated the phenotypic selection patterns in *Habenaria* species occurring in these areas: *Habenaria gourlieana* Gillies ex Lindl., *Habenaria johannensis* Barb. Rodr. and *Habenaria paulistana* J. A. N. Bat. & Bianch. These three *Habenaria* species have extremely precise pollination mechanisms in which the pollinaria are attached to the heads of long-tongued hawkmoths due to a mechanical fit between the flower and pollinator morphologies (Singer & Cocucci 1997, F.W. Amorim *et al.* Capítulo III).

METHODS

Study system

The orchid species studied are terrestrial herbs growing generally in grasslands with swampy soils and on the margins of streams and ponds. *H. gourlieana* grows in Northern Argentina, Bolivia, Uruguay, and Central to Southern Brazil, *H. johannensis* grows in Brazil, Paraguay and Bolivia, and *H. paulistana* is endemic to the Atlantic Rainforest of the São Paulo State in South-eastern Brazil (Batista *et al.* 2006). The three species have long inflorescences with a variable number of large flowers (3 up to 30), which are greenish-white in colour and emit pleasant scents after dusk (Singer & Cocucci 1997, Batista *et al.* 2006). Flower architecture is bilabiate, with an upper lip formed by the median sepal and lateral petals that cover the column, and a lower lip formed by the dissected labellum. The labellum develops into a very long and slender spur (up to 170 mm long) in which nectar is accumulated (Figure 1A). Spurs are partially or completely enclosed by the bracts of the flowers located below. The

rostellum bears two lateral stalks that present the viscidia apically. Rostellum morphology differs among the three species leading to pollinaria attachment on different areas of the hawkmoths' heads: the anterior margin of the eyes in *H. gourlieana* [Figure 1 B, E; (Singer & Cocucci 1997)]; the labial palps in *H. johannensis* (Figure 1 C, F; F.W. Amorim *et al.* Capítulo III); and the posterior lower margin of the eyes in *H. paulistana* (Figure 1 D, G; F.W. Amorim *et al.* Capítulo III). Flowers bear two long stigmatic stalks located at either side of the spur entrance and below the viscidia (Figure 1 B-D). Fruit set is pollinator-dependent in these three *Habenaria* species, as flower morphology does not allow self-pollination (Singer & Cocucci 1997, F.W. Amorim *et al.* Capítulo III).

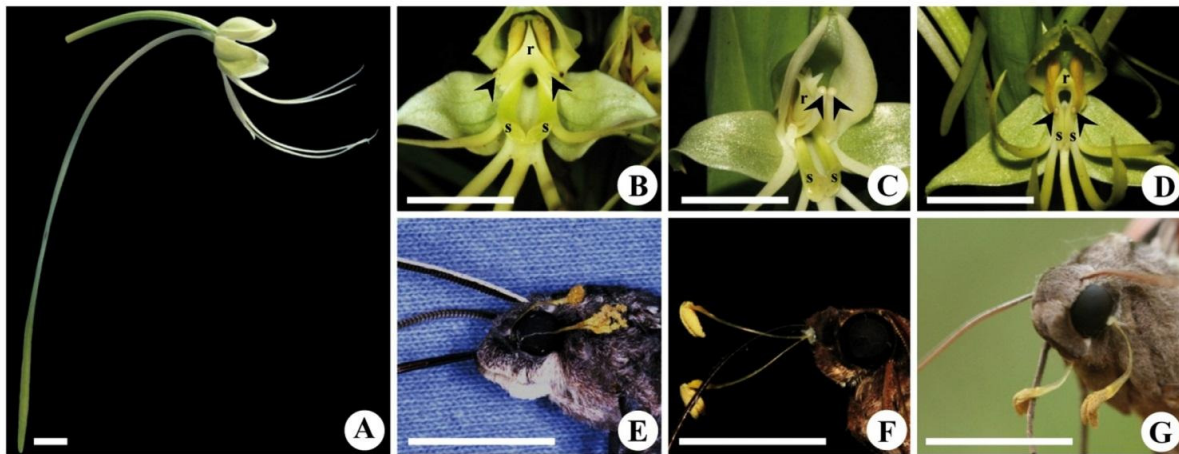


Figure 1. Flower morphology of three South American *Habenaria* species and place of pollinaria attachment onto the pollinator's head. A) Lateral view of *H. gourlieana* flower depicting the general morphology of the three long-spurred *Habenaria* species studied. Detail of the rostellum morphology (r), position of the viscidia (arrow heads) and stigmatic surfaces (s) in B) *H. gourlieana*; C) *H. johannensis* and D) *H. paulistana*. E) *H. gourlieana* pollinaria attached to the fore margin of *Manduca sexta* eye. F) *H. johannensis* pollinaria attached to the palps of a *M. brasiliensis* moth. G) *H. paulistana* pollinaria attached to the posterior lower margin of *Eumorpha obliquus* eye after manually contacting the hawkmoth head to the floral column. Scale bar equals 1 cm.

Fieldwork was carried out in a population of *H. gourlieana* located in El Durazno, Córdoba province, Argentina (31°21'S, 64°36'W, 1200 m a.s.l.) during the flowering seasons 2004 and 2005. The studied populations of *H. johannensis* and *H. paulistana* were located in the Núcleo Santa Virgínia (NSV) at Serra do Mar State Park, São Paulo State, Brazil. At this site *Habenaria johannensis* occurs exclusively along the road Oswaldo Cruz that traverses NSV (23°22'S, 45°11'W, 900 m a.s.l.). The *Habenaria paulistana* population is located inside the NSV (23°19'S, 45°08' W, 914 m a.s.l.). Observations were made during the 2010-2011 flowering seasons of *H. johannensis* and during 2009-2011 for *H. paulistana*. The populations of the two *Habenaria* species studied in the area of NSV do not overlap in either flowering phenology or spatial distribution, and occur in sites with distinct microclimatic conditions generated by Serra do Mar mountain chain.

Pollinators

Hawkmoths were collected using light traps (16 hours in the *H. gourlieana* population, 72 hours in the *H. johannensis* population and 144 hours in the *H. paulistana* population). We used different time periods to collect hawkmoths because in the Brazilian sites the hawkmoth assemblage was more diverse and so that more effort was necessary to sample the hawkmoth species present in the area during orchid flowering periods (Moré *et al.* 2005, Amorim *et al.* 2009). Proboscis lengths were measured in captured hawkmoths using digital calipers (error, 0.01 mm) and moths were carefully inspected under a binocular microscope to determine if they were carrying orchid pollinaria or pollen loads from other plant species. In order to track actual pollinators (moths carrying pollinaria), we performed additional nocturnal observations of pollinator visits to flowering plants totalling 10 hours for *H. gourlieana*, 12 hours for *H. johannensis* and 80 hours for *H. paulistana*.

Because we did not record any natural pollinator visits to *H. johannensis* flowers during field observations, we attempted to do so experimentally in February 2011 with a flight cage of 2 m³ mounted over a flowering plant. Ten hawkmoths of five species (two *Agrius cingulata*, one

Adhemarius eurysthenes, two *Manduca diffissa*, two *M. florestan*, two *M. brasiliensis* and one *Xylophanes crenulata*) were captured in a light trap, and released within the cage, and their activity was observed under starlight conditions with the aid of night vision goggles (*Eyeclops*[®]) over three consecutive nights.

Traits measured

We measured spur lengths using digital calipers (error, 0.01 mm). To avoid serial variation along the inflorescence we only measured the first freshly open flower in the inflorescence. To determine the minimal tongue length required to reach the nectar in the flower spur, we also measured the nectar column height in a sample of 20 flowers from 6 to 10 different plants of each species. Flowers were covered for a period of 48 hours in order to prevent pollinator access and to allow nectar to accumulate in the spur. We also recorded the total number of flowers produced by each plant during the flowering season as well as plant height, as these variables may affect pollinator attraction and reproductive success (*e.g.* Johnston 1991, Maad 2000, Benitez-Vieyra 2006). However, since both variables were significantly correlated, subsequent analyses were performed using only the number of flowers.

To estimate reproductive successes, we recorded at the end of flowering season the number of fruits (female reproductive success) and the number of removed pollinaria (male reproductive success) per plant. The latter was possible since non-removed pollinaria remain intact in wilted flowers and developing fruits. Reproductive success was recorded for 81 *H. gourlieana* plants in 2005, 64 *H. paulistana* in 2010 and 63 *H. johannensis* in 2011.

Estimating selection measures and phenotypic selection analyses

We compared the reproductive success of the three *Habenaria* species using generalized linear models with binomial or Poisson error structure and penalized quasi-likelihood to control over-

dispersion (Zuur *et al.* 2009). Before conducting phenotypic analyses, the fitness values of each plant were divided by the corresponding population mean and plant traits were standardized. The intensity and pattern of phenotypic selection acting on spur length, and flower number, were estimated using the methodology of Lande & Arnold (1983). Separate phenotypic selection analyses were undertaken for each species as well as fitness measures. Selection gradients were estimated by multiple regressions to evaluate the direction and magnitude of selection on a specific trait independent of the indirect effect of other traits. Significant linear gradients (β) indicate that selection favours either higher or lower trait values, inducing changes in population means. Significant nonlinear selection gradients (γ) indicate concave nonlinear selection against extreme phenotypes (stabilizing selection), convex nonlinear selection against intermediate trait values (disruptive selection), or correlational selection on a given combination of traits.

Because residuals from regression analyses departed from normality, standard errors for selection gradients were calculated using bootstrap methods (Dixon 1993, Gross *et al.* 1998, Benitez-Vieyra *et al.* 2010). We generated 10,000 bootstrap samples from the original data set. Selection gradients estimated after each bootstrap were used to obtain a frequency distribution. A selection gradient was considered significant if the bias-corrected confidence percentile interval did not include zero (Dixon 1993, Gross *et al.* 1998, Benitez-Vieyra *et al.* 2010). We used the *boot* (Canty & Ripley 2011) package of R software vs. 2.13.0 (R Development Core Team 2011) to perform the bootstrapping and to estimate the 95%, 99% and 99.9% confidence intervals.

Because multiple regressions are constrained to adjust the best linear or quadratic approximation to the fitness surface, direct interpretation of selection gradients may occasionally be misleading [Mitchell-Olds & Shaw 1987, Brodie *et al.* 1995]. Hence, we applied the cubic spline non-parametric regression to avoid *a priori* assumptions about the shape of the relationship between traits and fitness (Schluter 1988). We used the *gam* routine of *mgcv* package of R software vs. 2.13.0 (Wood 2006) to estimate the cubic splines. For each univariate spline, we fixed the covariate at its mean value.

Smoothing parameters were obtained by minimizing the generalized cross-validation scores (Wood 2008), and Bayesian standard errors were obtained according to Wood (2006).

RESULTS

Pollinators

As is commonly found in the Neotropical region, the studied hawkmoth communities mainly comprised short-tongued moths and a few long-tongued ones (Table 1). The three *Habenaria* species were, however, pollinated exclusively by those few hawkmoth species with the longest proboscises, which were potentially able to reach the nectar concealed in the very long spurs (Figure 2, Table 1). The nectar column filled up to a third of the flower spurs (*H. gourlieana* 27.65 ± 11.69 mm, *H. johannensis* 47.06 ± 9.55 mm and *H. paulistana* 34.87 ± 8.89 mm). Thus, recorded pollinators were able to access nectar in almost all *H. gourlieana* and *H. johannensis* flowers (Figure 2A, B), but only in the shortest flowers of *H. paulistana* (Figure 2C).

Seven hawkmoth species were recorded for the *H. gourlieana* population (Table 1), but only five individuals of *Manduca sexta* were observed carrying pollinaria attached to the fore margin of their eyes (Figure 1E, 2A). *Manduca sexta* individuals also carried pollen from other six plant species present in the community, two of them having flowers with nectaries as long as *H. gourlieana*: *Oenothera affinis* Cambess. (Onagraceae) and *Mandevilla petraea* (A. St.-Hil.) Pichon (Apocynaceae), two with relatively short corolla tubes, the exotic *Mirabilis jalapa* L. (Nyctaginaceae) and *Cestrum parqui* L' Her. (Solanaceae), and two unidentified pollen types.

A total of 36 hawkmoth species were recorded in the area during the flowering seasons of *H. johannensis* and *H. paulistana* (Table 1). None of the light-trapped moths were observed carrying pollinaria and we did not record any visits in the field to *H. johannensis* flowers. But in the flight cage experiment, two of the five hawkmoths species released inside the cage visited *H. johannensis* flowers:

A. cingulata (n=2) and *M. brasiliensis* (n=2), and pollinaria were removed in one of the *A. cingulata* visits (Figure 2B). Pollinaria of *H. johannensis* was attached to the palp of the *A. cingulata* individual (F.W. Amorim *et al.* unpublished data). We recorded six hawkmoth visits to *H. paulistana* (Figure 2C), one from the long-tongued *M. brasiliensis*. The remaining visits were identified to genus level: a long-tongued *Manduca* (n=4) and a short-tongued *Xylophanes* (n=1). Putative hawkmoth pollinators of *Habenaria* species in Brazil were carrying pollen from other plants present in the community, mainly from the very long-tubed flowers of *Posoqueria latifolia* (Rudge) Roem. & Schult. (Rubiaceae) and *Hillia parasitica* Jacq. (Rubiaceae), as well as the brush-type flower of *Inga sessilis* (Leguminosae).

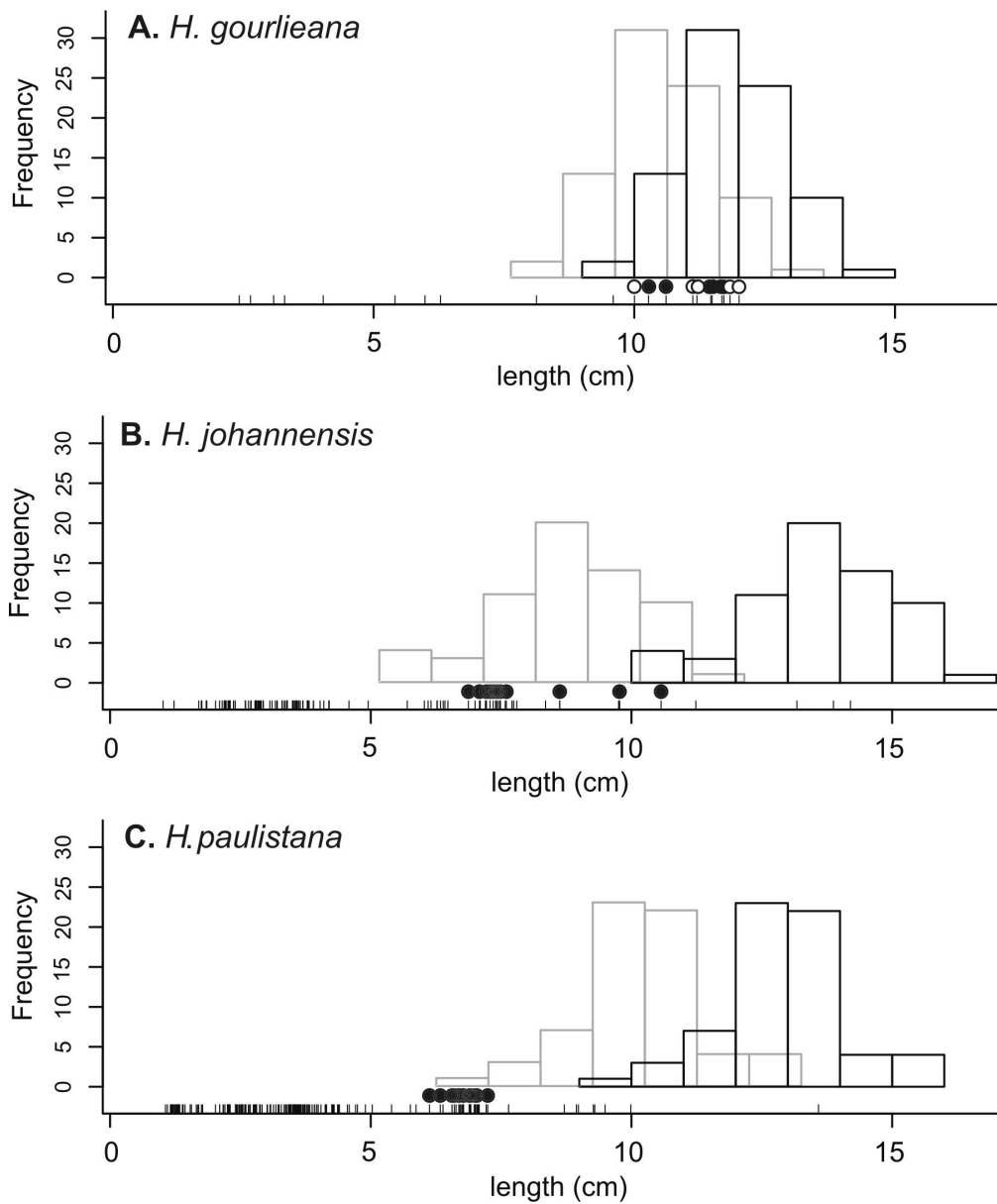


Figure 2. Match and mismatch between the lengths of orchid spurs and pollinators' proboscises. Black bars show spur length distributions in the three *Habenaria* species and grey bars the corrected histograms according to the mean height of the nectar column within the spur. The vertical black lines in the x axis show the proboscis lengths of all captured hawkmoths, circles represent individuals from those species seen either visiting flowers (filled) or captured carrying pollinaria attached to their eyes (open).

Table 1. Hawkmoth species captured during flowering season in the studied populations.

Hawkmoth species	Mean proboscis length $\pm$ SD (n)
<i>Habenaria gourlieana</i> population	
<i>Manduca sexta</i> (Linnaeus, 1763)*	109.61 $\pm$ 10.93 (12)
<i>Agrius cingulata</i> (Fabricius, 1775)	95.96 (1)
<i>Manduca diffissa</i> (Butler, 1871)	58.94 $\pm$ 4.44 (3)
<i>Erinnyis oenotrus</i> (Cramer, 1780)	40.34 (1)
<i>Erinnyis ello</i> (Linnaeus, 1758)	30.83 (1)
<i>Xylophanes tersa</i> (Linnaeus, 1771)	28.58 $\pm$ 6.15 (2)
<i>Erinnyis obscura</i> (Fabricius, 1775)	26.39 (1)
<i>Habenaria johannensis</i> and <i>H. paulistana</i> populations	
<i>Manduca rustica</i> (Fabricius, 1775)	132.86 $\pm$ 10.17 (3)
<i>Manduca janira</i> (Jordan, 1911)	101.61 $\pm$ 9.38 (3)
<i>Agrius cingulata</i> (Fabricius, 1775)***	95.65 $\pm$ 8.18 (4)
<i>Cocytius duponchel</i> Poey, 1832	84.27 (1)
<i>Manduca brasiliensis</i> (Jordan, 1911)**	71.48 $\pm$ 7.44 (22)
<i>Manduca diffissa</i> (Butler, 1871)	71.44 $\pm$ 3.45 (18)
<i>Manduca florestan</i> (Stoll, 1782)	61.28 $\pm$ 4.93 (10)
<i>Manduca lefeburii</i> (Guérin-Méneville, 1844)	53.99 (1)
<i>Eumorphia analis</i> (Rothschild & Jordan, 1903)	49.19 $\pm$ 8.02 (5)
<i>Pachylia ficus</i> (Linnaeus, 1758)	48.33 $\pm$ 3.32 (5)
<i>Pseudosphinx tetrio</i> (Linnaeus, 1771)	47.69 (1)
<i>Xylophanes chiron</i> (Drury, 1773)	47.07 $\pm$ 3.85 (5)
<i>Eumorphia obliquus</i> (Rothschild & Jordan, 1903)	44.54 $\pm$ 0.94 (2)
<i>Erinnyis alope</i> (Drury, 1773)	43.37 $\pm$ 2.69 (2)
<i>Eumorphia translineatus</i> (Rothschild, 1895)	43.18 $\pm$ 2.22 (10)
<i>Erinnyis oenotrus</i> (Cramer, 1780)	39.78 $\pm$ 3.50 (10)
<i>Xylophanes titana</i> (Druce, 1878)	36.71 $\pm$ 2.42 (10)
<i>Erinnyis ello</i> (Linnaeus, 1758)	36.11 $\pm$ 1.88 (24)
<i>Xylophanes crenulata</i> (Vaglia & Haxaire, 2009)	36.01 $\pm$ 2.08 (14)
<i>Xylophanes indistincta</i> Closs, 1915	34.4 (1)
<i>Xylophanes aglaor</i> (Boisduval, 1875)	34.12 $\pm$ 2.33 (5)
<i>Xylophanes xylobotes</i> (Burmeister, 1878)	34.10 $\pm$ 1.40 (6)
<i>Xylophanes tersa</i> (Linnaeus, 1771)	32.86 (1)
<i>Xylophanes thyelia</i> (Linnaeus, 1758)	30.78 $\pm$ 4.53 (11)
<i>Pachylioides resumens</i> (Walker, 1856)	26.70 $\pm$ 2.30 (6)
<i>Adhemarius gannascus</i> (Stoll, 1790)	26.53 $\pm$ 1.49 (4)
<i>Xylophanes isaon</i> (Boisduval, 1875)	26.10 $\pm$ 3.49 (23)
<i>Adhemarius eurysthenes</i> (R. Felder, 1874)	26.03 $\pm$ 1.47 (14)
<i>Enyo ocypete</i> (Linnaeus, 1758)	25.43 (1)
<i>Xylophanes porcus</i> (Hübner, 1823)	22.86 $\pm$ 1.85 (17)
<i>Callionima nomius</i> (Walker, 1856)	18.50 $\pm$ 0.08 (7)
<i>Callionima innuus</i> Rothschild & Jordan, 1903	16.60 $\pm$ 0.95 (2)
<i>Nyceryx alophus</i> (Boisduval, 1875)	13.56 $\pm$ 1.56 (5)
<i>Perigonia lusca</i> (Fabricius, 1777)	12.74 (1)
<i>Perigonia pallida</i> Rothschild & Jordan, 1903	12.15 $\pm$ 0.84 (8)
<i>Orecta lycidas</i> (Boisduval, 1875)	10.18 (1)

Species are arranged in decreasing order according to their mean proboscis length (mm). Asterisks show species carrying *H. gourlieana* (*) and *H. paulistana* (**) pollinaria attached to their eyes, or *H. johannensis* (***) pollinaria attached to their palps. Nomenclature and classification generally follows Kitching *et al.* (2012).

Phenotypic selection analyses

Habenaria species differed in fruit set ($F_{2,205} = 426.94$, $P < 0.0001$) and in the proportion of removed pollinaria ($F_{2,205} = 548.62$, $P < 0.0001$). In both cases *H. johannensis* achieved the lowest relative success (Table 2). Regarding total fitness, *Habenaria* species differed in the number of fruits produced per plant ($F_{2,205} = 239.23$, $P < 0.0001$) and in the number of exported pollinaria ($F_{2,205} = 199.17$, $P < 0.0001$). Again, *H. johannensis* had the lowest total reproductive success (Table 2).

Table 2. Mean and standard deviations of reproductive success estimates in three species of *Habenaria*.

Reproductive success measure	Mean (SD)		
	<i>H. gourlieana</i> (n=81)	<i>H. johannensis</i> (n= 63)	<i>H. paulistana</i> (n=64)
Fruits/flowers	0.395 (0.323)	0.036 (0.068)	0.288 (0.289)
Pollinaria exported /flowers	0.246 (0.128)	0.048 (0.072)	0.364 (0.216)
Fruits per plant	4.734 (4.958)	0.571 (1.266)	2.284 (2.753)
Pollinaria exported per plant	5.703 (4.173)	1.365 (2.253)	4.765 (3.909)

Significant directional selection acting on spur length was observed only through male function (number of exported pollinaria per plant) in *H. gourlieana* (Table 3, Fig. 3A), although, a significant disruptive selection gradient through male function was detected in *H. johannensis*. This pattern, however, was not evident in cubic splines because only a small group of long-spurred plants attained high reproductive success (Table 3, Fig. 3F). Significant directional selection acting on the number of flowers through male function was observed in *H. gourlieana* and *H. paulistana* (Table 3, Figs. 3B, 3D). In addition, significant directional selection was detected for a number of flowers through female function (number of fruits) in *H. gourlieana* and *H. paulistana* (Table 3, Figs. 3C, 3E).

Table 3. Multivariate phenotypic selection on spur length and flower number through male (number of exported polinaria per plant) and female (number of fruits) functions in *Habenaria gourlieana*, *H. johannensis* and *H. paulistana*. Standardized linear selection gradients (β_i), non-linear selection gradients (γ_{ii}), correlational selection gradients (γ_{ij}) and standard errors (SE) are shown. Standard errors and significance of selection gradients was estimated using 10,000 bootstrap samples and testing if bias-corrected accelerated percentile intervals include zero. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P<0.001.

Species	Character	Male function		Female function	
		β_i (SE)	γ_{ii} or γ_{ij} (SE)	β_i (SE)	γ_{ii} or γ_{ij} (SE)
<i>Habenaria gourlieana</i> (n= 81)	Spur length	0.153 (0.083)	*	0.139 (0.108)	0.124 (0.170)
	Flower number	0.563 (0.088)	***	0.801 (0.111)	*** 0.430 (0.189)
	Spur length $\times$ flower number		0.225 (0.112)		0.126 (0.141)
<i>Habenaria johannensis</i> (n= 63)	Spur length	0.027 (0.305)	1.219 (0.524) **	0.185 (0.260)	0.434 (0.512)
	Flower number	0.296 (0.259)	0.521 (0.489)	0.572 (0.472)	0.796 (0.894)
	Spur length $\times$ flower number		-0.389 (0.359)		-0.364 (0.470)
<i>Habenaria paulistana</i> (n= 64)	Spur length	0.114 (0.073)	-0.137 (0.124)	0.138 (0.119)	-0.219 (0.177)
	Flower number	0.484 (0.074)	*** -0.039 (0.132)	0.600 (0.178)	*** 0.305 (0.274)
	Spur length $\times$ flower number		0.144 (0.129)		-0.011 (0.232)

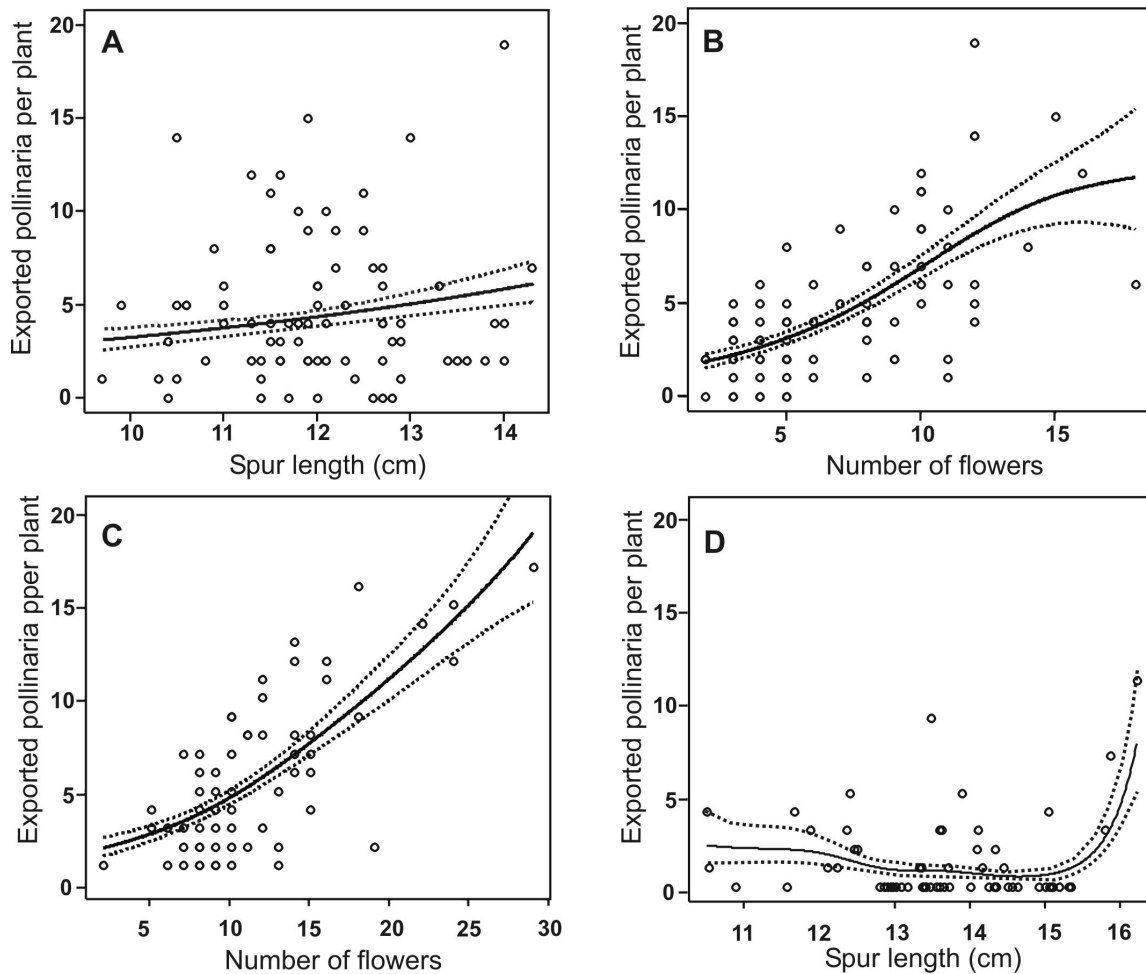


Figure 3. Cubic spline regressions between floral traits (spur length and number of flowers) and reproductive success (exported pollinaria) in three orchid species. *Habenaria gourlieana*: A & B. *H. paulistana*: C. *H. johannensis*: D. Dotted lines show ± 1 Bayesian standard errors.

DISCUSSION

The three studied *Habenaria* species share an extremely precise pollination mechanism in which pollinaria are attached to the hawkmoths' eyes or labial palps when they introduce the proboscises to drink the nectar accumulated in the very long spurs (Fig. 1B-D). Putative pollinators of these species belonged to those few hawkmoth species with the longest proboscises in the two studied communities (Table 1). Although spur length was similar among species, only *H. gourlieana* had a close match with the local long-tongued hawkmoth fauna. Most of the pollinators of this species (those moths bearing pollinaria attached to their eyes) had proboscises long enough to completely deplete or at least to have access to some nectar in nearly every flower in the population (Fig. 2). In the populations of the other *Habenaria* species spur length did not match the proboscises of the local fauna, with the exception of some few long-tongued hawkmoths able to reach nectar. This mismatch was somewhat compensated in *H. johannensis* by a relatively higher nectar column, and this permitted a closer nectar-proboscis match that could allow most pollinators to access nectar in approximately half of the flowers; a few pollinators could access nectar even from the longest flowers, although they were not be able to completely deplete them. In *H. paulistana* the nectar-proboscis mismatch was so strong that only a very small fraction of the flowers had nectar accessible to the putative pollinators (Fig. 2).

Habenaria species differed in male and female efficiency (Table 2). Few flowers set fruits or achieved pollinaria exportation in *H. johannensis*, despite the notable hawkmoth activity recorded for other plant species of the community that offer large amounts of nectar, such as *Inga sessilis* (Amorim *et al.* 2012 - Capítulo V). These observations suggest that hawkmoths may learn to avoid flowers that offer little accessible nectar (see Balkenius *et al.* 2004) and, consequently, the population of a species is on average not sufficiently rewarding. *Habenaria gourlieana* and *H. paulistana* had comparatively high reproductive success. Frequent visitation rates in *H. gourlieana*, indicated by the number of light-trapped moths carrying pollinaria and by direct observations in the field, explain the higher pollinaria

removal but, with the relatively low fruit set, reveals a low efficiency in pollen transference. Further studies are needed to determine whether the more precise mechanism of pollinaria deposition in *H. paulistana*, which has rigid pollinaria caudicles, could account for the higher pollen transference efficiency, as indicated by low pollinaria removal, but high fruit set.

Directional selection was only detected in favour of longer spurs in the *H. gourlieana* population and through male fitness (Table 3, Fig. 3A). The flower adaptive optimum was beyond the actual spur length mean because pollinators of this species had proboscis lengths that equalled or exceeded the spur length mean (see Armbruster *et al.* 2009), and so only plants with the longest spurs compel hawkmoths to contact their eyes to the viscidia while introducing proboscis to reach the concealed nectar. A similar pattern was observed in previous pollinator-mediated selection studies performed on other orchid species (Alexandersson & Johnson 2002, Maad & Alexandersson 2004, Benitez-Vieyra *et al.* 2006). In contrast, we did not find directional selection on spur length in *H. johannensis* or in *H. paulistana* populations (Table 3). Although a significant disruptive gradient was observed in *H. johannensis*, cubic spline analysis showed that most plants with spur lengths around the mean attained extremely low reproductive success and three long-spurred individuals with high fitness were responsible for most of the observed (Fig. 3D). Most pollinators of this species had proboscises shorter than the mean spur length and those few individuals with proboscises long enough to reach the nectar (*e.g. Manduca rustica*) were not observed visiting flowers or carrying pollinaria (Table 1). Although spur length varied from 98 to 159 mm in *H. paulistana*, most flowers were functionally similar because hawkmoths cannot obtain reward from them. Hence, due to this armament imbalance in plant-pollinator traits, no selection favouring longer spur phenotypes was found.

The mismatch apparently explains the absence of selection on spur length and poses the question of why did these orchid species develop such extremely long spurs? As a general pattern, plants usually have more exaggerated morphological traits than pollinators, because of the intrinsic differences in their physiological and developmental constraints (Anderson *et al.* 2010). Moreover,

Anderson *et al.* (2010) also noted that selection strength in floral and pollinator traits is dependent on the community context. Since putative pollinators of these three orchids also visit many other plant species in their respective communities, diffuse evolution processes may ensure that trait match selection in a particular plant species is less likely to occur (Anderson *et al.* 2010, Thompson 2005).

Furthermore, the absence of moths with very long proboscises which could act as selective agents may be attributed to spatiotemporal fluctuations in the hawkmoth assemblage (Amorim *et al.* 2009, Janzen 1986). It is known that insects of this group are prone to fluctuations in their abundance due to changes in climatic conditions, as well as resource availability for their larvae (Janzen 1993, Beck *et al.* 2006, Amorim *et al.* 2009, Ignatov *et al.* 2011). It is possible, therefore, that selection on spur length in these orchids may have operated periods in which hawkmoths with long proboscises were more abundant. Thus, the current spur length may be the result of punctuated selection events through time (Schemske & Horovitz 1989, Harder & Johnson 2009, Siepielski *et al.* 2009, Colombo & Joly 2010). Additionally, the response to such punctuated selection events would be delayed by the perennial nature and clonal reproduction of these orchid species, as less successful individuals can nevertheless remain in the population for many years (Pérez-Barrales *et al.* 2009). Our findings may be relevant in the current scenario of global climate change, a factor that could affect phenology, abundance and distributions of plants and pollinators, generating temporal mismatches between mutualistic partners (Beck *et al.* 2006, Hegland 2009). In particular, *Habenaria paulistana*, an endemic species with a very restricted distribution in the Atlantic Rainforest (Batista *et al.* 2006), may face a progressive absence of pollinators (due to spatial and phenological mismatches), and therefore a lack of sexual reproduction.

We detected phenotypic selection consistent with the functional match between flower morphology and pollinators as would be expected since Darwin's classical work on hawkmoth-pollinated orchids. However, our findings also indicated that pollinator-mediated selection could be a punctuated mechanism that varies through time and space (Schemske & Horovitz 1989, Pérez-Barrales

et al. 2009, Siepielski *et al.* 2009). In conclusion, this study highlights the need to consider local variations in pollinator assemblages across landscapes and their impact in moulding flower morphology.

REFERENCES

- Agosta SJ, Janzen DH (2005) Body size distributions of large Costa Rican dry forest moths and the underlying relationship between plant and pollinator morphology. *Oikos* 108: 183-193.
- Alexandersson R, Johnson SD (2002) Pollinator-mediated selection on floral tube length in a hawkmoth-pollinated *Gladiolus* (Iridaceae). *Proceedings of the Royal Society Series B: Biological Sciences* 269: 631-636.
- Amorim FW, de Avila Jr. RS, Camargo AJA, Vieira AL, Oliveira PE (2009) A hawkmoth crossroads? Species richness, seasonality and biogeographical affinities of Sphingidae in a Brazilian Cerrado. *Journal of Biogeography* 36: 662-674.
- Amorim FW, Galetto L, Sazima S (2012) Beyond the pollination syndrome: Nectar ecology and role of diurnal and nocturnal pollinators in the reproductive success of *Inga sessilis* (Fabaceae). *Plant Biology In Press* (DOI: 10.1111/j.1438-8677.2012.00643.x).
- Amorim FW, Wyatt GE, Sazima M (2012). Pollination contrivances of long-tubed sphingophilous plants in an Atlantic Rainforest of southeastern Brazil (Capítulo III).
- Anderson B, Alexandersson R, Johnson SD (2010) Evolution and coexistence of pollination ecotypes in an African *Gladiolus* (Iridaceae). *Evolution* 64: 960-972.
- Anderson B, Terblanche JS, Ellis AG (2010) Predictable patterns of trait mismatches between interacting plants and insects. *BMC Evolutionary Biology* 10: 204.
- Armbruster WS, Hansen TF, Pélabon C, Pérez-Barrales R, Maad J (2009) The adaptive accuracy of flowers: measurement and microevolutionary patterns. *Annals of Botany* 103: 1529-1545.

- Balkenius A, Kelber A, Balkenius C (2004) A model of selection between stimulus and place strategy in a hawkmoth. *Adaptive Behavior* 12: 21-35.
- Batista JAN, Bianchetti LB, Miranda ZJ (2006) A revision of *Habenaria* section *Macroceratitae* (Orchidaceae) in Brazil. *Brittonia* 58: 10-41.
- Beck J, Kitching IJ, Linsenmair E (2006) Effects of habitat disturbance can be subtle yet significant: biodiversity of hawkmoth-assemblages (Lepidoptera: Sphingidae) in Southeast-Asia. *Biodiversity and Conservation* 15: 465-486.
- Benitez-Vieyra S, Medina AM, Glinos E, Cocucci AA (2006) Pollinator-mediated selection on floral traits and size of floral display in *Cyclopogon elatus*, a sweat bee-pollinated orchid. *Functional Ecology* 20: 948-957.
- Benitez-Vieyra S, Ordano M, Fornoni J, Boege K, Domínguez CA (2010) Selection on signal-reward correlation: limits and opportunities to the evolution of deceit in *Turnera ulmifolia* L. *Journal of Evolutionary Biology* 23: 2760-2767.
- Brodie ED, Moore AJ, Janzen FJ (1995) Visualizing and quantifying natural selection. *Trends in Ecology and Evolution* 10: 313-318.
- Canty A, Ripley B (2011) boot: Bootstrap R (S-Plus) Functions. R package version 1.3-3.1
- Colombo AF, Joly CA. (2010) Brazilian Atlantic Forest lato sensu: the most ancient Brazilian forest, and a biodiversity hotspot, is highly threatened by climate change. *Brazilian Journal of Biology*, 70: 697-708.
- Creswell JE (1998) Stabilizing selection and the structural variability of flowers within species. *Annals of Botany* 81: 463-473.
- Darrault RO, Schlindwein C (2002) Esfingídeos (Lepidoptera, Sphingidae) no Tabuleiro Paraibano, nordeste do Brasil: abundância, riqueza e relação com plantas esfingófilas. *Revista Brasileira de Zoologia* 19: 429-443.

- Darwin C (1877) On the various contrivances by which British and foreign orchids are fertilized by insects. New York: D. Appleton. 300 pp.
- Dixon PM (1993) Population sampling and bootstrapping in complex designs. In: Scheiner SM, Guretvich J, editors. Design and analysis of ecological experiments, New York: Chapman & Hall. pp. 290-318.
- Duarte Júnior JA, Schlindwein C (2005) Riqueza, abundância e sazonalidade de Sphingidae (Lepidoptera) num fragmento de Mata Atlântica de Pernambuco, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 22: 662-666.
- Endress PK (1994) Diversity and evolutionary biology of tropical flowers. Cambridge: Cambridge Univ Press. 511 pp.
- Gross J, Husband BC, Stewart SC (1998) Phenotypic selection in a natural population of *Impatiens pallida* Nutt. (Balsaminaceae). *Journal of Evolutionary Biology* 11: 589-609.
- Haber WA, Frankie GW (1989) A tropical hawkmoth community: Costa Rican dry forest Sphingidae. *Biotropica* 21: 155-172.
- Harder LD, Johnson SD (2009) Darwin's beautiful contrivances: evolutionary and functional evidence for floral adaptation. *New Phytologist* 183: 530-545.
- Hegland SJ, Nielsen A, Lázaro A, Bjerknes AL, Totland Ø (2009). How does climate warming affect plant-pollinator interactions? *Ecology Letters* 12: 184-195.
- Ignatov II, Janovec JP, Centeno P, Tobler MW, Grados J, et. al. (2011) Patterns of richness, composition, and distribution of sphingid moths along an elevational gradient in the Andes-Amazon region of Southeastern Peru. *Annals of the Entomological Society of America* 104: 68-76.
- Janzen DH (1986) Biogeography of an unexceptional place: what determines the saturniid and sphingid moth fauna of Santa Rosa National Park, Costa Rica, and what does it mean to conservation biology? *Brenesia* 25/26: 51-87.

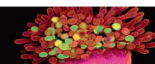
- Janzen DH (1993) Caterpillar seasonality in a Costa Rican dry forest. In: Stamps NE, Casey TM, editors. *Caterpillars: ecological and evolutionary constraints on foraging*, New York: Chapman & Hall. pp. 448-477.
- Johnson SD, Steiner KE (1997) Long-tongued fly pollination and evolution of floral spur length in the *Disa draconis* complex (Orchidaceae). *Evolution* 51: 45-53.
- Johnston MO (1991) Natural selection on floral traits in two species of *Lobelia* with different pollinators. *Evolution* 45: 1468-1479.
- Kingsolver JG, Pfennig DW (2007) Patterns and power of phenotypic selection in nature. *BioScience* 57: 561-572.
- Kitching IJ, Smith CR, Blagoderov B, Sadler SJ, Young RPW, et al. (2011). CATE (Creating a Taxonomic E-Science). Sphingidae, Version 1.3. Available: <http://www.cate-sphingidae.org> via the Internet. Accessed on May 2012.
- Lande R, Arnold SJ (1983) The measurement of selection on correlated characters. *Evolution* 37: 1210-1226.
- Maad J (2000) Phenotypic selection in hawkmoth-pollinated *Platanthera bifolia*: targets and fitness surfaces. *Evolution* 54: 112-123.
- Maad J, Alexandersson R (2004) Variable selection in *Platanthera bifolia* (Orchidaceae): phenotypic selection differed between sex functions in a drought year. *Journal of Evolutionary Biology* 17: 642-650.
- Mitchell-Olds T, Shaw RG (1987) Regression analysis of natural selection: statistical inference and biological interpretation. *Evolution* 41: 1149-1161.
- Moré M, Kitching IJ, Cocucci AA (2005) Sphingidae: Esfíngidos de Argentina. *Hawkmoths of Argentina*. Buenos Aires, LOLA (Literature of Latin America). 166 pp.
- Nilsson LA (1988) The evolution of flowers with deep corolla tubes. *Nature* 334: 147-149.

- Nilsson LA, Jonsson L, Ralison L, Randrianjohany E (1987) Angraecoid orchids and hawkmoths in central Madagascar: specialized pollination systems and generalist foragers. *Biotropica* 19: 310-318.
- Pauw A, Stofberg J, Waterman RJ (2009) Flies and flowers in Darwin's race. *Evolution* 63: 268-279.
- Pérez-Barrales R, Pino R, Albaladejo RG, Arroyo J (2009) Geographic variation of flower traits in *Narcissus papyraceus* (Amaryllidaceae): do pollinators matter? *Journal of Biogeography* 35: 1411-1422.
- R Development Core Team (2011) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available: <http://www.R-project.org/> via the Internet. Accessed on 05 Dec 2011.
- Robertson JL, Wyatt R (1990) Evidence for pollination ecotypes in the yellow-fringed orchid, *Platanthera ciliaris*. *Evolution* 44: 121-133.
- Rodríguez-Gironés MA, Llandres AL (2008) Resource competition triggers the co-evolution of long tongues and deep corolla tubes. *PLoS One* 3: e2992. doi:10.1371/journal.pone.0002992
- Rodríguez-Gironés MA, Santamaría L (2006) Models of optimal foraging and resource partitioning: deep corollas for long tongues. *Behavioral Ecology* 17:905–910.
- Rodríguez-Gironés MA, Santamaría L (2007) Resource Competition, Character Displacement, and the Evolution of Deep Corolla Tubes *American Naturalist* 170: 455–464.
- Schemske DW, Horovitz CC (1989) Temporal variation in selection on a floral character. *Evolution* 43: 461-464.
- Schluter D (1988) Estimating the form of natural selection on a quantitative trait. *Evolution* 42: 849-861.
- Johnson SD, Steiner KE (2000) Generalization versus specialization in plant pollination systems. *Trends in Ecology and Evolution* 15: 140-143.

- Siepielski A, DiBattista JD, Carlson SM (2009) It's about time: the temporal dynamics of phenotypic selection in the wild. *Ecology Letters* 12: 1261-1276.
- Singer RB, Cocucci AA (1997) Eye attached hemipollinaria in the hawkmoth and settling moth pollination of *Habenaria* (Orchidaceae): A study on functional morphology in 5 species from subtropical South America. *Botanica Acta* 110: 328-337.
- Stebbins GL (1970) Adaptive radiation of reproductive characteristics in Angiosperms, I: Pollination mechanism. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 1: 307-326.
- Steiner KE, Whitehead VB (1990): Pollination adaptation to oil-secreting flowers - *Rediviva* and *Diascia*. *Evolution* 44: 1701-1707.
- Thompson JN (2005) The geographic mosaic of coevolution. Chicago: The University of Chicago Press. 443 pp.
- Wasserthal LT (1997) The pollinators of the Malagasy star orchids *Angraecum sesquipedale*, *A. sororium* and *A. compactum* and the evolution of extremely long spurs by pollinator shift. *Botanica Acta* 110: 343-359.
- Whittall JB, Hodges SA (2007) Pollinator shifts drive increasingly long nectar spurs in columbine flowers. *Nature* 447: 706-710.
- Wood SN (2006) Generalized Additive Models: An Introduction with R. Boca Raton: Chapman and Hall/CRC. 391 pp.
- Wood SN (2008) Fast stable direct fitting and smoothness selection for generalized additive models. *Journal of the Royal Statistical Society Series B: Statistical Methodology* 70:495-518.
- Zhang ZQ, Kress WJ, Xie WJ, Ren PY, Gao JY, et al. (2011) Reproductive biology of two Himalayan alpine gingers (*Roscoea* spp., Zingiberaceae) in China: pollination syndrome and compensatory floral mechanisms. *Plant Biology* 13: 582-589.
- Zuur A, Ieno EN, Walker NJ, Saveliev AA, Smith GM. 2009. Mixed effects models and extensions in ecology with R. New York NY: Springer.

CAPÍTULO V

plant biology



Plant Biology ISSN 1435-8603

RESEARCH PAPER

Beyond the pollination syndrome: nectar ecology and the role of diurnal and nocturnal pollinators in the reproductive success of *Inga sessilis* (Fabaceae)

F. W. Amorim¹, L. Galetto² & M. Sazima³

¹ Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

² Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (UNC-CONICET), Universidad Nacional de Córdoba (UNC), Córdoba, Argentina

³ Departamento de Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

Keywords

Atlantic rain forest; bat pollination; hawkmoth pollination; hummingbird pollination; legume; Mimosoideae; pollination biology.

Correspondence

F.W. Amorim, Departamento de Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Caixa Postal 6109, CEP 13083-970, Campinas, São Paulo, Brazil. E-mail: amorimfelipe@yahoo.com

Editor

A. Dafni

Received: 23 February 2012; Accepted: 25 May 2012

doi:10.1111/j.1438-8677.2012.00643.x

ABSTRACT

Inga species present brush-type flower morphology allowing them to be visited by distinct groups of pollinators. Nectar features in relation to the main pollinators have seldom been studied in this genus. To test the hypothesis of floral adaptation to both diurnal and nocturnal pollinators, we studied the pollination ecology of *Inga sessilis*, with emphasis on the nectar secretion patterns, effects of sequential removals on nectar production, sugar composition and the role of diurnal and nocturnal pollinators in its reproductive success. *Inga sessilis* is self-incompatible and pollinated by hummingbirds, hawkmoths and bats. Fruit set under natural conditions is very low despite the fact that most stigmas receive polyads with sufficient pollen to fertilise all ovules in a flower. Nectar secretion starts in the bud stage and flowers continually secreting nectar for a period of 8 h. Flowers actively reabsorbed the nectar a few hours before senescence. Sugar production increased after nectar removal, especially when flowers were drained during the night. Nectar sugar composition changed over flower life span, from sucrose-dominant (just after flower opening, when hummingbirds were the main visitors) to hexose-rich (throughout the night, when bats and hawkmoths were the main visitors). Diurnal pollinators contributed less than nocturnal ones to fruit production, but the former were more constant and reliable visitors through time. Our results indicate *I. sessilis* has floral adaptations, beyond the morphology, that encompass both diurnal and nocturnal pollinator requirements, suggesting a complementary and mixed pollination system.

INTRODUCTION

Generalist pollination systems are more common and widely distributed than pairwise species interactions (Waser 1996; Fenster *et al.* 2004; Freitas & Sazima 2006), and can be viewed as a successful evolutionary tendency within some plant groups (Torres & Galetto 2002). Floral adaptations to a pollinator group depend on its spatiotemporal reliability by means of the visitation frequency and pollination effectiveness (Stebbins 1970; Artz *et al.* 2010; Burkle & Alarcón 2011). Since flower morphology is molded by plant-pollinator interactions, mixed or generalized pollination systems are favored and eventually fixed in a plant population, when plants are effectively pollinated by different groups of pollinators (Waser *et al.* 1996; Fleming *et al.* 2001; Brunet & Holmquist 2009; Sahli & Conner 2011). However, to be effective, pollination depends on the matching between particular characteristics of flowers (*e.g.* morphology, anthesis duration, scent and reward production) and pollinator morphology, as well as behavior (Armbruster *et al.* 2004; 2009).

Pollination syndromes cannot be accurately predicted for most flowering plants solely by floral morphology observations (Waser *et al.* 1996; Ollerton *et al.* 2009). Flowering phenology, timing of flower opening, anthesis duration, and nectar chemical compounds and its secretion patterns are also directly related to the pollination system and pollinator activity on flowers (Southwick *et al.* 1981; Baker & Baker 1983; Pleasants 1983; Galetto & Bernardello 2005; Bobrowiec & Oliveira 2012). As such, the traditional concept of pollination syndromes cannot be used precisely to define the most common or effective pollinator (Freitas & Sazima 2006; Ollerton *et al.* 2009), but as general hypotheses to design studies on pollination ecology.

Some species are susceptible to flower visitors' activity both during the day and at night, especially those with flowers that remain opened and functional for long periods of time. In those species, the definition of the most efficient pollinator group depends not only on quantifying the relative frequency of each group, but also on exclusion experiments of day or night visitors, aiming to

quantify the relative contribution of each pollinator group to the plant reproductive success (Miyake & Yahara 1998; 1999; Fleming *et al.* 2001; Young 2002; Wolff *et al.* 2003; Gimenez-Benavides *et al.* 2007; Muchhala *et al.* 2009; Maruyama *et al.* 2010; Walter 2010; Ortega-Baes *et al.* 2011). Night and day pollinated plants, generally involve complementary pollination systems, in which pollen transfer among flowers is maximized when flowers remain opened taking the advantage of the activity of both diurnal and nocturnal pollinators (Jennersten & Morse 1991; Miyake & Yahara 1998; 1999; Sazima *et al.* 1994; Maruyama *et al.* 2010).

Nectar is the main reward in flowering plants and it is consumed by a huge variety of animals (Proctor *et al.* 1996). Composed mainly by sugars, nectar can also include amino acids, proteins, lipids and many other substances in its composition. Especially for nectar sugar composition, there are some general trends associating nectar to the pollinator guild. Flowers visited mainly by hummingbirds and sphingids, for example, tend to present sucrose predominant nectars, whereas those visited by bats are hexose predominant (*e.g.* Baker & Baker 1983; von Helversen 1993; Koptur 1994; Galetto & Bernardello 2003; Chalcoff *et al.* 2006). Also other nectar features, such as secretion rhythms and production pattern may be strongly influenced by interaction with pollinators (Bobrowiek & Oliveira 2012; but see Galetto & Bernardello 2005 and references therein). Since natural selection favors plant adaptation to the “most effective pollinator” (*sensu* Stebbins 1970), patterns of floral rewards production, as nectar, may correspond to the activity period of the main pollinators (Heinrich 1975). Hence, in night and day pollinated plants, if both groups of flower visitors act as effective pollinators, we should expect nectar characteristics (*e.g.* secretion pattern and sugar composition) congruent to the requirements of both pollinator groups.

Among plants pollinated by day and night visitors are many species of *Inga* Willd. (Fabaceae), a common genus of trees in the Neotropical region (Pennington 1997). The genus includes about 300 exclusively Neotropical species, which possess brush-type flowers with reduced calyx and corolla parts, gynoecium with one single carpel, usually unilocular and one pistil that equals or exceeds the

length of stamens. The androecium acts as the main flower display to visitors, consisting of a set of numerous stamens fused at the base forming a tube where the nectar is located and offered as the main reward to flower visitors (Koptur 1983; Pennington 1997). This arrangement of the floral morphology allows the nectar to be accessed by a wide spectrum of visitors, ranging from small bees and moths to large hawkmoths, as well as, vertebrates, such as hummingbirds and bats (Koptur 1983; 1984; Pennington 1997). Thus, the pollination of a single *Inga* species may involve many distinct groups of visitors (Koptur 1983; 1984; Pennington 1997).

Therefore, *Inga* species can be used as a good model to test general hypotheses of flower adaptations (*e.g.* nectar secretion patterns, sugar composition) to different groups of pollinators, as well as to investigate the role of diurnal and nocturnal pollinators to the reproductive success of species with different groups of pollinators. In this sense, we hypothesize an adjustment between nectar sugar composition and secretion dynamics through flower anthesis with the activity and requirements of diurnal and nocturnal pollinators, as well as a correspondence with their role on the reproductive success of *Inga sessilis* (Vell.) Mart. In order to evaluate this hypothesis we obtained data on (1) the activity of nectar secretion during the flower lifespan, (2) the effect of the sequential nectar removal on its total production, (3) the nectar sugar composition, (4) the main pollinators and the effectiveness of diurnal and nocturnal flower visitors on fruit set.

MATERIAL AND METHODS

Study site and species characterization

This study was conducted between the years 2008 and 2011 in a highland Atlantic Rainforest area (Montane Ombrophilous Dense Forest) in the Núcleo Santa Virginia (NSV), Brazil (23°17'–24° S/45°03'–45°11' W), of the Serra do Mar State Park (SMSP), Brazil. The total area encompassed by the reserve is approximately 5,000 ha and is situated between the municipalities of São Luiz do Paraitinga,

Cunha, and Ubatuba (Veloso *et al.* 1991). The altitude varies from 850 m to 1,200 m a.s.l. and the climate is Tropical Temperate (Cwa according to Köppen 1948), with average annual precipitation above 2.000 mm and never falling below 60 mm during the driest months (Setzer 1966).

Inga sessilis is a tree species that can reach up to 18 m in height and its distribution is associated with rainforests in southeastern Brazil. In the Atlantic Rainforest, *I. sessilis* occurs mainly in Montane forests, inside the forest or associated with secondary vegetation areas, as well as in the roadsides (Pennington 1997). At NSV the species is commonly observed on the margins of the state highway Oswaldo Cruz (SP-125), which transverses the NSV and where plants are lower in height ranging from 4 m to 10 m.

Phenology and floral biology

Floral phenology was observed in 20 plants using Fournier's (1974) semi-quantitative method. Flowering intensity was quantified by attributing numerical grades which assigned the relative percentage of the number of flowers produced per plant. The grades varied between 0 - 3, with 0 indicating the absence of flowers and 1, 2, and 3 indicating the presence in the following percentage intervals: 1% - 25%, 26% - 75%, and 76% - 100% of the branches on one observed plant. Flowering pattern was then classified following Newstrom *et al.* (1994).

Floral anthesis was observed in 200 marked flowers in 10 plants (20 flowers per plant). Flowers were followed from the opening until the senescence, characterized by the wilting of stamens. Stigmatic receptivity was tested using an aqueous solution of 20% hydrogen peroxide (Kearns & Inouye 1993) and the emission of floral odors was recorded in the field from 20 (five plants) fully opened flowers, which were sealed in glass jars from 10 to 15 minutes and then we described qualitatively the floral odor (Kearns & Inouye 1993).

To determine the operative flower length, considered as the distance between the nectary and the anthers/stigma, 10 flowers from five plants were measured with digital calipers (error, 0.01 mm).

We quantified the number of ovules per ovary in 32 flowers from eight plants. The number of pollen grains per polyad and pollen viability was recorded in 40 polyads from four plants, one flower per plant, collected during the pre-anthesis period. Five anthers per flower were dissected under stereomicroscope to quantify the number of polyads per anther and the number of pollen grains per polyad. Two polyads per anther were stained with 2% Carmin Acetic and a gentle pressure was applied on the slide cover to isolate the pollen grains. The pollen viability was estimated by the number of fully stained pollen grains in each polyad. Pollen/ovule ratio (P/O) was determined by multiplying the number of pollen grains per polyad by the number of polyad per anther and then by the average of anthers per flower. The number of anthers was quantified, in 20 flowers from 20 plants, by counting the number of stamens per flower. To investigate the potential capacity of one polyad to fertilize all ovules in a single ovary, we calculated the ratio of the number of pollen grains per polyad by the mean number of ovules per ovary (PP/O).

Nectar: secretion pattern, removal effects and sugar composition

Nectar secretion dynamics, floral response to repeated nectar removals and sugar composition analyses were performed according to Torres & Galetto (1998) and Galetto & Bernardello (2005). Nectar volume was measured using a graduated microliter syringe (Hamilton, NV, USA) and sugar concentration (percentage of sucrose, mass/mass) was measured with a pocked refractometer (Atago, Tokyo, Japan 0-50%). The amount of sugars in the nectar was quantified and expressed in milligrams following Galetto & Bernardello (2005). Nectar secretion pattern was determined using nine plants, in which 35 flowers (three to five flowers per plant) were isolated in nylon mesh bags during the bud stage. Nectar dynamics was accompanied during 24 hours period (17:00 to 17:00h) with four hours intervals, with nectar measures made from the flower opening until its senescence. In total, the dynamics of nectar throughout anthesis was analyzed in seven flower sets of five flowers each. The nectar was drained and measured once in each flower set allowing the nectar to accumulate until the

next measurement in an untouched new flower set. Each flower set consisted of flowers from different individuals in order to cover interplant variations and determine nectar dynamics (according to Galetto & Bernardello 2005). The different phases of the nectar dynamics linked to the accumulated nectar in the different flower sets (*i.e.* active nectar secretion, cessation, and resorption) were inferred from the plotted values of these data. The net nectar production rate per hour (NNPR) was calculated as the ratio of the amount of sugar secreted (in milligrams) in each interval by the number of hours of the secretion period. The net nectar resorption rate (NNRR) was similarly calculated as the ratio of the amount of nectar resorbed (in milligrams) by the number of hours of the resorption period (Torres & Galetto 1998; Galetto & Bernardello 2005).

Floral response to successive nectar removals was evaluated in an experimental design simulating the activity of flower visitors (*i.e.*, multiple visits to the same flowers) over the course of anthesis. We compared total accumulated nectar between “visited” (*i.e.*, nectar experimentally drained) and unvisited flowers (control) in seven sessions of four hours intervals during the flower lifespan in seven flower sets. A new untouched flower set was included in each subsequent removal session. Thus, in the first set of flowers (set 7), the nectar was drained seven times, the second (set 6) six times, and so on until set 1 (see details in Bernardello & Galetto 2005). In this last group (control), nectar was drained only once allowing its accumulation until the end of the flower anthesis, marked by the wilting of stamens.

To analyze the nectar sugar composition, nectar samples were collected in the field and stored on chromatography paper Whatman No. 1 (Galetto & Bernardello 2005). These samples were processed in gas-liquid chromatography (GLC) for determining the types of sugars in nectar and their respective proportions (Galetto & Bernardello 2005). The sucrose/hexoses ratio was calculated following Baker & Baker (1983), as follow: $\text{sucrose}/(\text{glucose} + \text{fructose})$, in which values below 0.1 indicate hexose-rich nectar and equal to or greater than 1.0, sucrose-rich nectar. Intermediate values between 0.1 and 0.499 indicate nectar hexose-dominant and greater than or equal to 0.5, a sucrose-

dominant nectar. Samples were taken from non-visited flowers in three periods of the anthesis: first between 17:00 and 18:00h, second between 21:00 and 22:00h and the last, in the morning, between 07:00 and 08:00h. The same set of flowers was used to obtain nectar samples for GLC analyses.

Pollinators and compatibility system

Floral visitors and pollinators were determined using focal observations in groups of 40-60 flowers per plant totaling 40 h. In February 2009, the frequency of floral visitors was quantified for two hours, between 22:00 and 00:00h. In February 2011 the observations were conducted in sessions of 15 min. every half hour between 16:00 and 01:00h. The remaining observations were only qualitative (without quantifying the frequency of floral visitors), conducted between 06:00 and 17:00h in 20 plants. Observations of nocturnal visitors were performed using night-vision goggles and floral visitors were photographed for identification. In order to record richness and abundance of the potential pollinators, hawkmoths were collected monthly in light traps, throughout a period of one year and the pollen loads were analyzed to identify those species that carried *I. sessilis* polyads.

The pollination efficiency was estimated by the proportion of polyads deposited on stigmatic surfaces of flowers exposed to visitors during their lifespan. Polyads deposition was quantified observing pistils under fluorescence microscopy for analysis of pollen tube growth (Martin 1959). For this purpose, 40 flowers (3-4 flowers per plant) were collected from 12 plants in May 2011.

To evaluate the compatibility system, experiments of controlled pollination were conducted. Flower buds in pre-anthesis were previously isolated with nylon mesh bags to exclude floral visitors. For these experiments we used 12 individuals, at least 0.5 km apart from each other to perform the following pollination treatments: cross-pollination (flowers were emasculated and hand-pollinated with polyads from other plants); self-pollination (flowers were hand-pollinated using polyads of the same plant); spontaneous self-pollination (unmanipulated flowers were kept bagged); emasculation (pre-anthesis flowers were emasculated to verify the fruit formation by apomixis); and a control (flowers

were marked but not bagged and remained exposed to pollinators). The index of self-incompatibility (ISI *sensu* Bullock 1985) was calculated as the ratio between the numbers of fruits formed by self-pollination/cross-pollination. The upper limit adopted to consider a species as self-incompatible was 0.25 (according to Oliveira & Gibbs 2000).

Pistils from 20 self and 20 cross-pollinated flowers were collected 24 hours after pollination and fixed in a solution of formalin, acetic acid and ethylic alcohol 50% (FAA 50%) for 24 hours and subsequently stored in ethylic alcohol 70%. The pistils were stained with aniline blue for pollen tube growth observation under fluorescence microscopy (Martin 1959).

Efficiency of diurnal *versus* nocturnal pollinators

In order to assess the effectiveness of the day and night pollinators, exclusion experiments were conducted. To exclude diurnal visitors, flowers were isolated with nylon mesh bags just before dawn (around 04:30 to 05:30h) until late afternoon in the same day, and to exclude nocturnal ones, flowers were bagged at dusk (around 17:00 to 18:00h) until sunrise (around 05:30 to 06:00h), when they were exposed to daytime visitors. Pollinator exclusion experiments were conducted in March 2010 and January 2011. During the first year seven plants were used and 87 and 89 flowers were isolated at day and night, respectively. In the second year, 10 plants were used, in which 246 flowers were used per treatment (day and night). In total, 668 flowers were used, 333 for the exclusion of diurnal visitors and 335 for exclusion of nocturnal visitors. The fruit set was evaluated 35 to 60 days after pollinator exclusion treatments.

Analyses

To analyze the effect of experimentally drained nectar (*i.e.*, removals by floral visitors) in the total amount (milligrams) of sugar produced by each set of flowers, we performed a one-way analysis of variance (ANOVA) to evaluate the differences in the milligrams of sugars among sets of flowers,

with a Tukey *post hoc* test for multiple comparisons among pairs of means (Zar 2010). These differences were evaluated comparing set of flowers before the resorption period (until set 2). Hence, set 1 was not included in the statistical analysis, since the effects of successive nectar removal on its total production are mixed with resorption effects. The difference in the total number of fruits produced during both years by diurnal and nocturnal pollinators was assessed with a Chi-square test (χ^2). We did not analyze each year separately as the number of fruits was too small for a statistical analysis.

RESULTS

Phenology and floral biology

Inga sessilis is a mass-flowering species and bloomed throughout the year, displaying a continual flowering pattern (*sensu* Newstrom *et al.* 1994). However, two flowering peaks were more evident (one from December to February and a shorter during May-June), in which the majority of plants were flowering (Fig. 1). The species present brush-type hermaphroditic flowers arranged in axillary racemes. Flowers are white, present reduced perianth, a single pistil and numerous stamens (184.20 ± 28.05) (Fig. 2 A). The distance between the nectary and anthers/stigma (flower length) is 8.51 ± 0.38 cm. Anthesis lasts 24h and flower opening begins around 11:00 to 13:00h with a slow expansion of the pistil and stamens. Flowers only become fully opened late in the afternoon around 17:00h, at which point the pistil and stamens were totally expanded, anthers were dehiscent exposing the polyads, and concomitantly the stigma was receptive characterized by the shiny appearance of its surface. Flower scent was slightly sweet during all its lifespan. Flower senescence began in the following day and was characterized by wilting of stamens, but the pistil remained erect wilting in the next day.

Flowers presented 24.19 ± 3.06 ovules per ovary and each anther contained 12 ± 0.0 polyads, each one composed of 32 ± 0.0 pollen grains with 98% of viability. Eleven (27.5%) of 40 polyads showed

unviable pollen at all. Considering the mean number of stamens per flower (184.20 ± 28.05), the total number of pollen grains in each flower is over 70,000. Thus, the P/O ratio was approximately 2,944 and PP/O was 1.33.

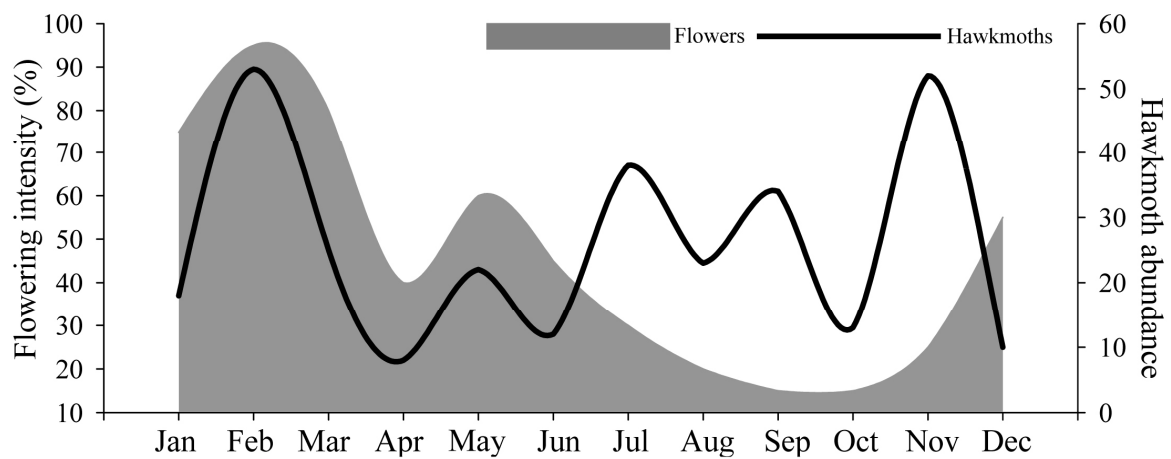


Figure 1. Flowering phenology of *Inga sessilis* and abundance of its hawkmoth in a Montane Ombrophilous Dense Forest at the Núcleo Santa Virginia, Serra do Mar State Park – SP.

Nectar: secretion pattern, removal effects and chemical composition

Nectar secretion started during pre-anthesis and newly opened flowers had around 50-100 μL , with 6% of sugar concentration (3 A-B). Activity of nectar secretion in bagged flowers lasted 8h with a NNPR of 4.13 mg h^{-1} . After 01:00h nectar volume, concentration and amount of sugars remained constant for the following hours (Fig. 3), hence this period was interpreted as a cessation in nectar secretion. Then, a reduction in the nectar standing crop of the bagged flowers was detected. During this stage occurred a constant decrease of nectar volume and amount of solutes (Fig. 3 C), while flowers began wilting. This period was interpreted as one of active nectar resorption, in which nectar recovering by the flower started few hours before flower senescence with a NNRR of 6.33 mg h^{-1} .

Experimentally drained flowers increased nectar production up to twofold in the total amount of sugars (TAS) per flower (Table 1). ANOVA comparisons showed significant differences ($F_{5,23} = 4.092$, $P=0.0085$), between the control (set 2, $\text{TAS}=26.27\pm22.99 \text{ mg}$) and sets 4 ($\text{TAS}=50.63\pm10.43 \text{ mg}$) and 5 ($\text{TAS}=56.53\pm7.28$; Table 1). Nectar sugar composition changed over flower lifespan. In newly opened flowers nectar was sucrose-dominant, becoming hexose-dominant 4-5h after flower opening and hexose-rich during the following hours (Table 2).

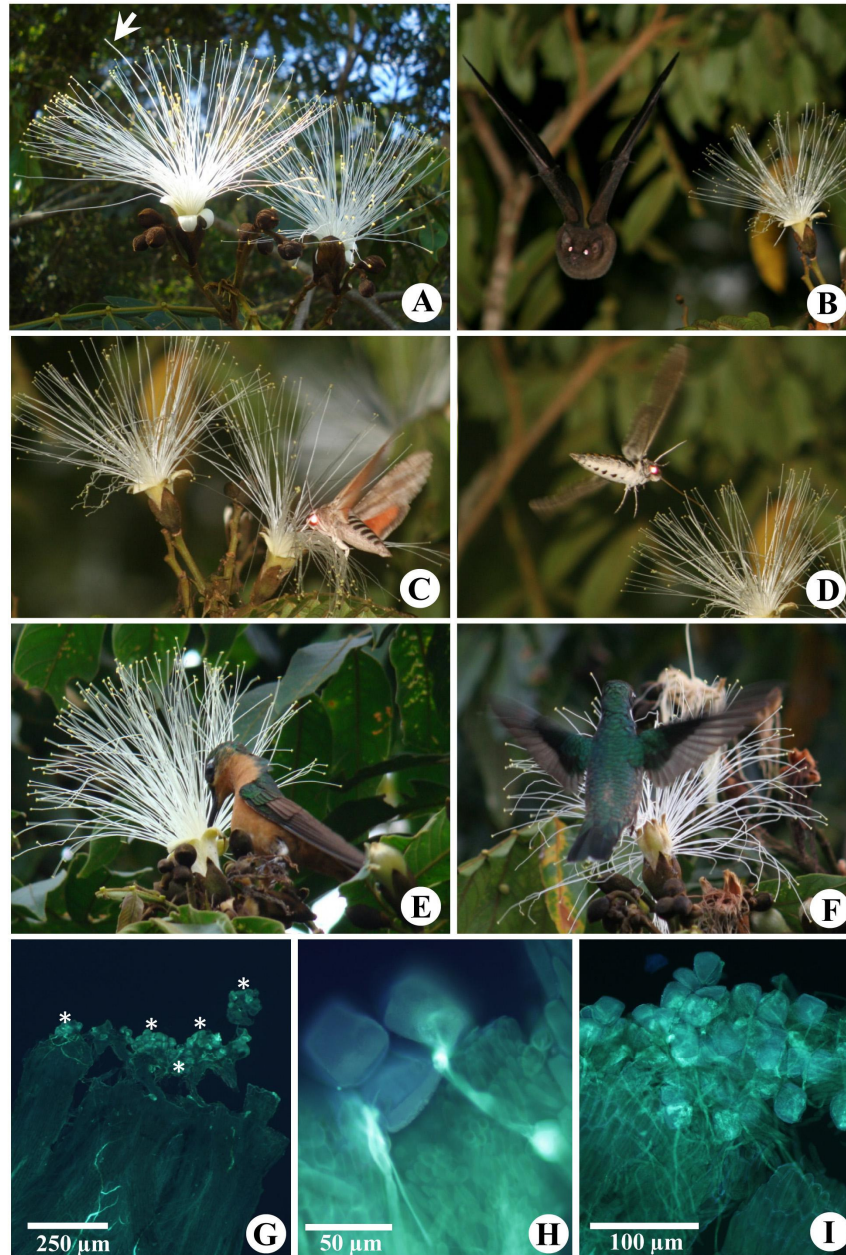


Figure 2. *Inga sessilis* flower morphology, visitors and pollen germination in a Montane Ombrophilous Dense Forest at Núcleo Santa Virginia, Serra do Mar State Park – SP. **A.** Inflorescence and flower morphology. Note the prominent style (arrow) among the stamens; **B.** *Glossophaga soricina* after visiting a flower; **C.** Short-tongued *Erynnis ello* resting on the stamens while accessing nectar; **D.** Long-tongued hawkmoth *Manduca brasiliensis* hovering during a visit; **E.** A perched female *Clytolaema rubricauda* while taking nectar; **F.** A female *Clytolaema rubricauda* approaching a flower; **G.** Polyads germinating (asterisks) on the stigma of flowers pollinated under natural conditions; **H.** Pollen tubes of a self-pollinated flower; **I.** Pollen tubes of a cross-pollinated flower.

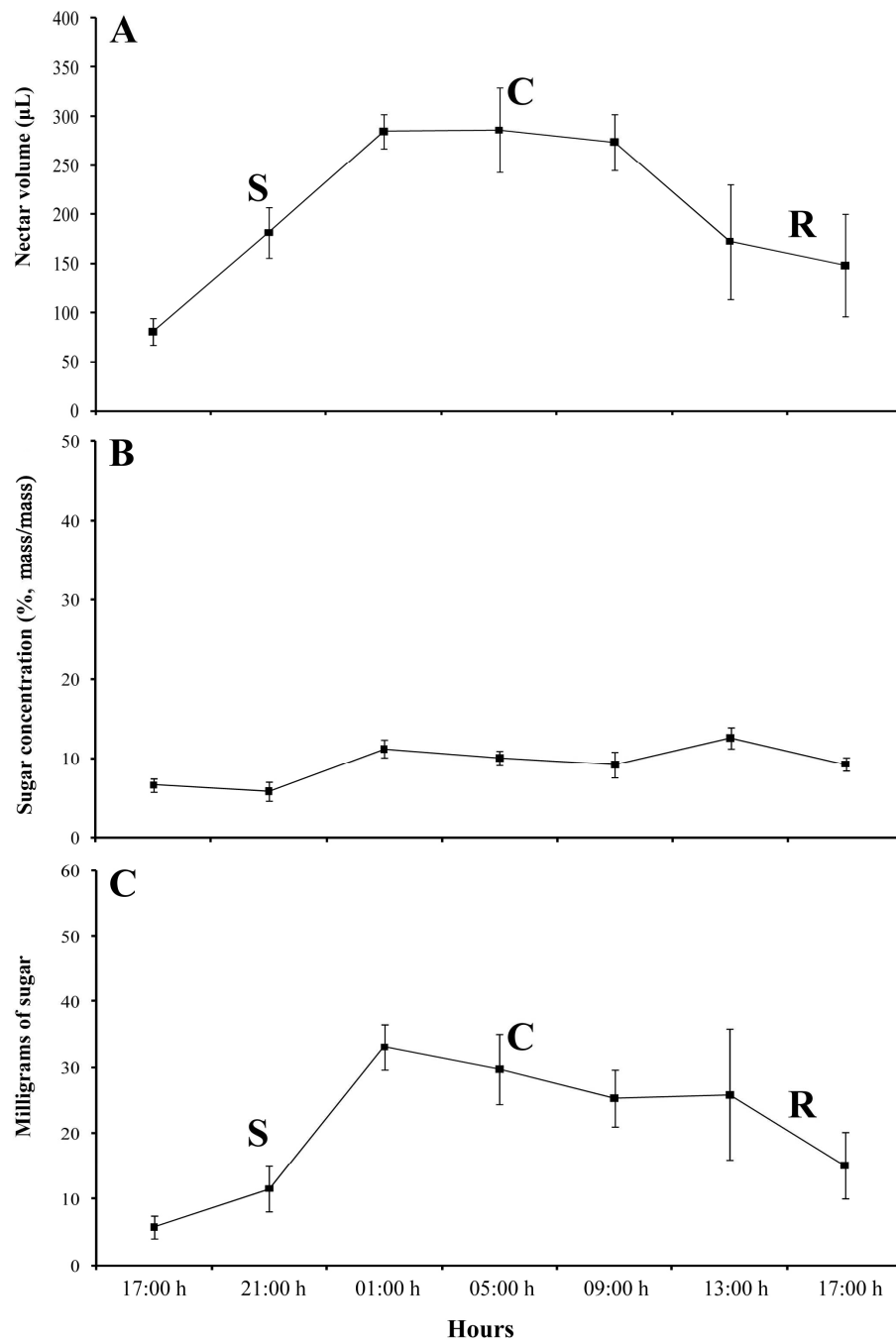


Figure 3. Nectar features of *Inga sessilis* over flower lifespan in a Montane Ombrophilous Dense Forest at the Núcleo Santa Virginia, Serra do Mar State Park – SP. **A.** Nectar volume; **B.** Nectar sugar concentration; and **C.** Milligrams of nectar sugars. Symbols represent mean $\pm$ standard error. **S** = Secretion period; **C** = Cessation period; **R** = Resorption period

Table 1. Nectar removal effects on total nectar production of *Inga sessilis* flowers in a Montane Ombrophilous Dense Forest at Núcleo Santa Virginia, Serra do Mar State Park – SP. Data represent mean $\pm$ standard deviation of volume (μL), concentration (% mass/mass) and milligrams (mg) of nectar sugar produced per flower (n=5 flowers per set of flowers sampled in each time).

Set of flowers		Sampling time							Total amount produced *
		17h00	21h00	01h00	05h00	09h00	13h00	17h00	
7	mg	5.76 $\pm$ 3.74	7.61 $\pm$ 4.11	9.64 $\pm$ 5.02	8.54 $\pm$ 3.77	7.80 $\pm$ 2.17	3.83 $\pm$ 5.10	1.37 $\pm$ 1.87	44.91 $\pm$ 10.50
	μL	81.20 $\pm$ 30.44	135.80 $\pm$ 45.83	143.00 $\pm$ 38.08	123.80 $\pm$ 21.55	106.4 $\pm$ 47.5	38.4 $\pm$ 51.43	14.80 $\pm$ 20.38	643.4 $\pm$ 118.11
	%	6.60 $\pm$ 1.82	5.40 $\pm$ 1.52	6.40 $\pm$ 2.07	6.60 $\pm$ 2.70	8.17 $\pm$ 3.13	6.68 $\pm$ 6.61	3.60 $\pm$ 4.98	a
6	mg		11.53 $\pm$ 7.70	9.59 $\pm$ 9.01	8.75 $\pm$ 8.49	6.81 $\pm$ 3.82	0.19 $\pm$ 0.27	1.20 $\pm$ 2.68	37.97 $\pm$ 26.98
	μL		181.00 $\pm$ 57.20	121.20 $\pm$ 64.74	108.20 $\pm$ 53.36	93.20 $\pm$ 38.98	13.00 $\pm$ 24.68	0.60 $\pm$ 1.34	518.0 $\pm$ 174.11
	%		5.80 $\pm$ 2.59	6.20 $\pm$ 3.70	6.60 $\pm$ 3.78	6.80 $\pm$ 3.35	6.40 $\pm$ 6.19	0.04 $\pm$ 0.08	a
5	mg			33.08 $\pm$ 7.53	10.64 $\pm$ 3.50	8.89 $\pm$ 2.77	3.31 $\pm$ 1.77	0.61 $\pm$ 0.59	56.53 $\pm$ 7.28
	μL			284.60 $\pm$ 38.51	103.80 $\pm$ 22.50	88.20 $\pm$ 25.79	29.00 $\pm$ 15.73	10.00 $\pm$ 8.86	515.60 $\pm$ 50.15
	%			11.20 $\pm$ 2.49	9.80 $\pm$ 1.79	9.80 $\pm$ 1.64	11.00 $\pm$ 0.71	5.00 $\pm$ 3.16	b
4	mg				29.72 $\pm$ 10.48	13.07 $\pm$ 1.81	3.29 $\pm$ 1.70	0.49 $\pm$ 0.54	50.63 $\pm$ 10.43
	μL				286.00 $\pm$ 85.91	129.5 $\pm$ 22.94	30.50 $\pm$ 17.37	9.25 $\pm$ 7.27	455.25 $\pm$ 83.40
	%				10.00 $\pm$ 1.83	10.00 $\pm$ 2.45	10.75 $\pm$ 1.26	6.00 $\pm$ 2.71	b
3	mg					25.33 $\pm$ 9.59	2.34 $\pm$ 1.15	0.32 $\pm$ 0.37	27.99 $\pm$ 8.94
	μL					273.60 $\pm$ 63.78	24.20 $\pm$ 13.08	6.00 $\pm$ 7.97	303.80 $\pm$ 61.51
	%					9.20 $\pm$ 3.63	9.60 $\pm$ 2.61	3.60 $\pm$ 3.58	a
2	mg						25.82 $\pm$ 22.24	0.46 $\pm$ 0.50	26.27 $\pm$ 22.99
	μL						172.40 $\pm$ 129.99	5.60 $\pm$ 5.32	178.0 $\pm$ 129.67
	%						12.60 $\pm$ 2.97	6.20 $\pm$ 3.90	a
§ 1	mg							15.06 $\pm$ 12.17	15.06 $\pm$ 10.08
	μL							148.00 $\pm$ 126.61	148.00 $\pm$ 126.61
	%							9.25 $\pm$ 1.53	

*Different letters in lines represent significant differences among sets by Tukey *post hoc* test, $P < 0.05$.

§ The last group was not considered in the statistical analyses because it is included within the absorption period (see Material and Methods for more details).

Table 2. Nectar sugar composition of *Inga sessilis* flowers in different times of the anthesis. Classification of nectar type followed Baker & Baker (1983), in which: SD = sucrose-dominant nectar; HD = hexose-dominant nectar; HR = hexose-rich nectar.

Time of removal	Range		Sugar composition			Proportion	Type
	Volume (μL)	Concentration (%)	Sucrose (S)	Fructose (F)	Glucose (G)	S/(F+G)	
17h00-18h00	22 - 58	17.5 - 21,5	36.03	36.77	27.21	0.563	SD
21h00-22h00	18 - 37	13.5 - 18,5	9.29	53.58	37.14	0.102	HD
07h00-08h00	50 - 194	10.5 - 17,0	5.17	58.64	36.18	0.055	HR

Pollinators and compatibility system

Inga sessilis flowers were visited throughout their lifespan, with bats and hawkmoths as the main nocturnal visitors (Fig. 2 B-D) and hummingbirds as the main diurnal visitors (Fig. 2 E, F). There was a great variation in the visitation frequencies among nights, as well as among years of both groups of visitors (Fig. 4). In February 2009 a total of 140 visits by hawkmoths and 71 by bats was recorded after 2 h of observation (22:00 to 00:00h). When these visits are analyzed through observation periods of 15 min., 6 to 37 hawkmoth visits and 2 to 18 bat visits were recorded in each period (Fig. 4). However, during February 2011 we recorded only 0 to 3 hawkmoths and 0 to 2 bat visits every 15 min. of observation (Fig. 4). Hawkmoth visits began early in the evening just after the sunset, while the first bat visit was recorded after 20:00h, but visitation frequencies of both groups increased later (after 20:00h). *Glossophaga soricina* (Pallas) was the most common bat species visiting *I. sessilis* (Fig. 2 B), and at least two unidentified bat species visited the flowers occasionally. Bats invariably contacted anthers and stigma when visiting *I. sessilis* flowers, and so did short and long-tongued hawkmoths during their visits (Fig. 2 C, D). Based on direct observations of pollinators and pollen load analysis of light-trapped hawkmoths, 15 species were recorded carrying *I. sessilis* polyads on their bodies, wings and tongues (Table 3). Moth proboscis length of these species ranged between 2.6 and 7.1 cm, all shorter than the operative flower length (Table 3), and their abundance partially coincided with *I. sessilis* flowering phenology, mainly during the two flowering peaks (Fig. 1).

Table 3. Hawkmoth species recorded either visiting flowers or carrying *Inga sessilis* polyads in a Montane Ombrophilous Dense Forest at the Núcleo Santa Virginia, Serra do Mar State Park – SP. Visitation data is based on the pollen load of light-trapped moths throughout a period of one year.

Species	Months												Proboscis Mean ± SD
	Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov	Dec	
<i>Adhemarius eurysthenes</i> (Felder 1874)	1	9	3	-	7	7	27	14	11	-	4	-	2.60±0.15
<i>Adhemarius gannascus</i> (Stoll 1790)	-	-	-	2	-	-	2	1	3	1	4	-	2.65±0.15
<i>Erinnyis ello</i> (Linnaeus 1758)*	2	2	-	-	-	-	1	-	-	-	2	-	3.61±0.19
<i>Erinnyis oenotrus</i> (Cramer 1780)	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	2	4	3.98±0.35
<i>Eumorpha analis</i> (Roth. & Jor. 1903)*	2	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.92±0.80
<i>Hemeroplanes longistriga</i> (Roth. & Jor. 1903)	-	-	-	-	1	1	2	2	1	-	-	-	3.97±0.18
<i>Manduca diffissa</i> (Butler 1871)*	-	6	4	-	-	-	-	-	-	3	11	1	7.14±0.35
<i>Manduca florestan</i> (Stoll 1782) *	-	6	3	-	-	-	-	-	-	-	3	1	6.13±0.49
<i>Manduca brasiliensis</i> (Jordan 1911)*	-	1	9	-	-	-	-	-	1	2	1	-	7.11±0.75
<i>Pachylia ficus</i> (Linnaeus 1758)	3	1	-	-	-	-	-	2	3	1	-	1	4.83±0.33
<i>Pachylioides resumens</i> (Walker 1856)*	3	2	2	1	-	-	1	-	1	1	1	-	2.67±0.23
<i>Xylophanes ceratomioides</i> (G.&R 1866)	6	2	1	-	-	-	-	-	3	4	4	2	3.60±0.21
<i>Xylophanes chiron</i> (Drury 1773)	1	1	-	1	-	1	-	-	-	-	3	-	4.71±0.39
<i>Xylophanes isaon</i> (Boisduval 1875)	-	14	2	-	-	-	3	2	7	-	9	-	2.61±0.35
<i>Xylophanes thyelia</i> (Linnaeus 1758)	-	2	1	4	14	3	2	2	4	1	8	1	3.78±0.45

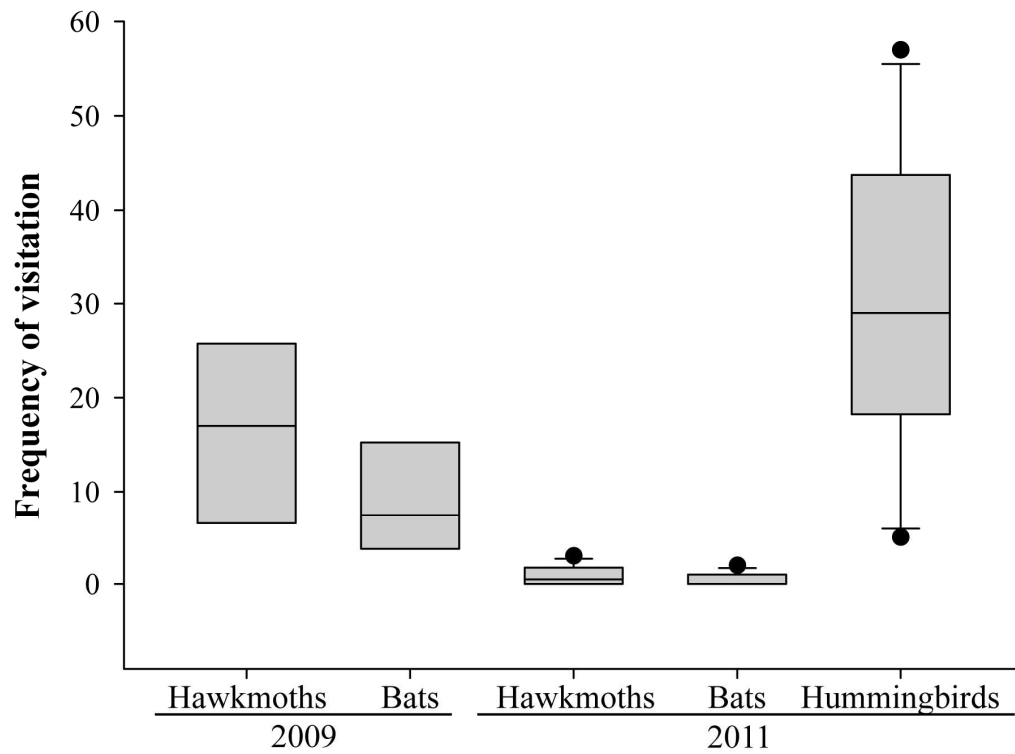


Figure 4. Number of hawkmoths, bats and hummingbirds visits to *Inga sessilis* flowers in a Montane Ombrophilous Dense Forest at the Núcleo Santa Virginia, Serra do Mar State Park – SP. Observations were made during February 2010 and 2011 between 16:00-01:00h and the number of visits is plotted in 15 min. intervals.

Hummingbirds were the main diurnal visitors (Fig. 2 E, F). Four species were observed visiting *I. sessilis* flowers: *Clytolaema rubricauda* (Boddaert), *Florisuga fusca* (Vieillot), *Leucochloris albicollis* (Vieillot) and *Thalurania glaucopis* (Gmelin). Between 8 to 67 hummingbird visits were recorded during every 15 min. of observation (Fig. 4), and visits began before flowers were fully opened, anthers were dehiscent and stigmata were receptive. As nectar was available during the flower opening, they forced their bills among stamens to reach the nectar. A single hummingbird could visit between 2 to 15 flowers of the same plant in sequence, often not contacting anthers and stigma which happened either when they landed or hovered beside the flower to take nectar (Fig. 2 E). However, during hovering visits over the flowers (Fig. 2 F), anthers and stigma were usually contacted. *Bombus* species were commonly observed visiting *I. sessilis* flowers, but due to their small size and behavior on flowers they did not contact anthers and stigma. Some diurnal and less frequent hummingbird-moths, *Aellopos* spp., also visited *I. sessilis* flowers acting as occasional pollinators.

More than 80% of the flowers exposed to pollinators in natural conditions were pollinated, presenting 1-5 polyads adhered on the stigmatic surface (Fig. 2 G). However, less than 5% of flowers set fruits (Table 4), despite the massive blooming. Experiments of controlled pollination indicated that *I. sessilis* is self-incompatible and presents an ISI of 0.05, although pollen tube germination was observed in both self and cross-pollination treatments (Fig. 3 H, I). The incompatibility reaction probably occurs at ovary level as pollen tubes reached the ovary even in self-pollinated pistils. Fruit set in self-pollinated pistils was close to zero and no fruits were formed by apomixis (Table 4).

Efficiency of nocturnal versus diurnal pollinators

Analyzing together the results of both years, 2010 and 2011, pollinator exclusion experiments showed differences in the relative contribution of diurnal and nocturnal visitors to the fruit set [diurnal: 1.2% (4 fruits) and nocturnal: 3.6% (12 fruits), $\chi^2=4.0$, $df=1$, $P=0.045$]. Considering each year separately, the relative contribution of nocturnal pollinators to fruit set was also greater. In 2010 the

percentage of flowers which set fruits due to activity of diurnal pollinator was 2.3% (two fruits), and nocturnal pollinators activity resulted in 4.5% of fruit set (four fruits). In 2011 the percentages for diurnal and nocturnal pollinator activities were respectively: 0.81% (two fruits) and 3.25% (eight fruits).

Table 4. Percentage of fruit set of *Inga sessilis* after pollination treatments in a Montane Ombrophilous Dense Forest at the Núcleo Santa Virginia, Serra do Mar State Park – SP.

Pollination treatments	Flowers	Fruits (%)
Cross pollination	80	21 (26.3)
Hand self-pollination	80	1 (1.25)
Autonomous self-pollination	100	0 (0)
Emasculation (agamospermy)	100	0 (0)
Control (natural conditions)	1054	48 (4.55)

DISCUSSION

Phenology and floral biology

The higher flowering intensity of *I. sessilis* during the wettest period follows the general pattern of Atlantic rainforest trees (Morellato *et al.* 2000). This pattern was also recorded in non-arboreous bat-pollinated plants in another highland Atlantic rainforest area in southeastern Brazil (Sazima *et al.* 1999). Additionally, the abundance of hawkmoth species effectively carrying *I. sessilis* polyads partially coincided with *I. sessilis* flowering intensity, especially during the periods of higher blooming (Fig. 1). However, hawkmoth activity was still high even during the months of the lowest *I. sessilis* flowering intensity. This pattern of synchrony (at least in certain periods of the year) between hawkmoth abundance and blooming of *Inga* species was recently recorded in an Atlantic rainforest in northeastern Brazil (Cruz-Neto *et al.* 2011). Nonetheless, hawkmoth abundance is highly associated with other factors, such as temperature, humidity and rainfall (Amorim *et al.* 2009). On the other hand,

typical hummingbird-pollinated floras in highland Atlantic rainforest areas in southeastern Brazil (Buzato *et al.* 2000; Freitas *et al.* 2006), have many species with continual flowering pattern as *I. sessilis*.

Flower scent probably plays a small role in *I. sessilis* pollinators' attraction (Koptur 1983). The showy androecium acts as the main flower display in the attraction of visitors especially during the blooming peaks when *I. sessilis* can be characterized as a typical mass-flowering species (*sensu* Gentry 1974). The PP/O ratio found in *I. sessilis* indicated that a single polyad is potentially able to fertilize all ovules of a flower and the remarkable P/O ratio is two to nine times greater than those in other *Inga* species (Koptur 1984). Such a P/O ratio is common to self-incompatible species, especially in mass-flowering plants, which are prone to high rates of pollen limitation due to excessive geitonogamy (Cruden 1977; Koptur 1984).

Nectar: secretion pattern, removal effects and chemical composition

The period of highest nectar secretion in *I. sessilis* was related to the highest pollinator frequencies on flowers. The dynamic of nectar production seems to be directly related with pollinator activity (Zimmerman & Pyke 1986; Torres & Galetto 1998; SanMartin-Gajardo & Sazima 2005). Recent studies have demonstrated that the period of nectar secretion can play an important role in hawkmoth visitation activity on flowers (Guerenstein *et al.* 2004a; Thom *et al.* 2004), since flowers produce high levels of CO₂ during nectar secretion, which can be used by hawkmoths as a clue of nectar availability (Guerenstein *et al.* 2004 a; b; Thom *et al.* 2004; Goyret *et al.* 2008).

The results of nectar removal experiments suggest that pollinator activity on flowers may increase the total amount of nectar secreted. Similar patterns, suggesting an increase in the total amount of nectar production due to pollinator activity, were also recorded for other *Inga* species (Koptur 1994). It is interesting to notice that in *I. sessilis* nectar production increases in higher rates when removed by

nocturnal flower visitors more so than when it is removed by diurnal ones (Table 1), suggesting a closer relationship with nocturnal pollinators.

Nectar resorption was characterized by a constant decrease of nectar volume and amount of sugars. As sugar production in *I. sessilis* can reach until 56 mg per flower and one single plant can produce hundreds of flowers per day during many weeks, nectar resorption may serve as an important strategy to save and reallocate resources to the production of new flowers, fruits and seeds (Pyke 1991; Nepi & Stpicińska 2007; Agostini *et al.* 2011).

During night the nectar sugar composition of *I. sessilis* seems better to fit bat requirements (Faegri and van der Pijl 1980; von Helversen 1993; Koptur 1994), as the nectar composition of typical hummingbird and hawkmoth pollinated flowers are predominated by sucrose (Baker & Baker 1983; Koptur 1994). However, *I. sessilis* also presents sucrose-rich nectar during the first hours of the flower's lifespan (before sunset), a time when hummingbirds were the most frequent visitors, and after sunset when hawkmoths are active. Nevertheless, hawkmoths remain active during most of the night when nectar becomes hexose-dominant/rich. In this sense such nectar sugar features encompass the preferences of diurnal and nocturnal pollinators.

Pollinators and compatibility system

As recorded for other *Inga* species (Koptur 1984; Cruz-Neto *et al.* 2007), our results indicate that *I. sessilis* is self-incompatible and pollinator dependent to sexual reproduction. Previous studies on *Inga* species have shown their dependency on long-distance pollinator movements among plants to set fruit (Koptur 1984). In such species, cross-pollination between plants distant less than 0.5 km form less fruits than crosses between plants in distances higher than 1.0 km apart (Koptur 1984). Despite flowering continuously over all year long and blooming massively during the flowering peaks, where one single plant can produce up to 300 flowers per day, fruit set in *I. sessilis* in natural conditions was as low as 5%. On the other hand, our analyses revealed that more than 80% of flowers were effectively

pollinated, presenting polyads germinating on the stigmatic surface. This indicates that *I. sessilis* visitors are very likely promoting self-pollination in more than 75% of flowers. Similar patterns of low fruit set were observed on at least 12 species of *Inga*, despite the relative high frequency of visitors (Koptur 1984; Cruz-Neto *et al.* 2007; Cruz-Neto *et al.* 2011).

Such a small fruit set was observed as well in *Caryocar brasiliensis* Camb. (Caryocaraceae), a common tree of the Cerrado vegetation in Central Brazil, which flowers are similar in morphology of *I. sessilis* and also share as pollinators, hawkmoths, bats and hummingbirds (Gribel & Hay 1993). Recent genetic analyses have shown that the fruit set in *C. brasiliensis*, mostly results from self-pollination and short-distance pollen dispersal (up to 200 m) among individuals (Collevati *et al.* 2010). Assuming similar trends for *I. sessilis*, the low fruit set may be a result of pollen limitation not by absence of pollinators, but due to low quantities of cross-pollen. In this sense, pollinator behavior in conjunction with self-incompatibility, probably are the main causes of the low fruit set recorded in *I. sessilis*.

Efficiency of diurnal *versus* nocturnal pollinators

Hummingbirds are common pollinators of many *Inga* species (Koptur 1984; Pennington 1997). Based on our qualitative observations, the frequency of visits of these birds in *I. sessilis* throughout the year is higher and seems to be much more constant and reliable than the visits of nocturnal pollinators. However, hummingbird contribution to the reproductive success of *I. sessilis* is significantly smaller than that of nocturnal pollinators. All hummingbird species observed visiting *I. sessilis* belong to the Trochilinae sub-family, which are characteristically territorial, especially when resources are aggregated (Feinsinger 1976, Justino *et al.* 2012), as is the case of mass-flowering *Inga* species. Additionally to the territorial behavior, hummingbirds often perform illegitimate visits on *I. sessilis* flowers, a foraging behavior which greatly limits pollen dispersal over long distances and between plants as well, both of which are required to optimize fruit production in *Inga* species (Koptur 1984).

Bats and hawkmoths are the main pollinators of *I. sessilis* contributing significantly more to fruit production than diurnal pollinators. Based solely on the classical concepts of pollination syndrome, at first view *I. sessilis* could be considered only as chiropterophilous (Vogel 1969; Faegri and van der Pijl 1980). Although it was not possible to quantify separately the relative contribution of bats and hawkmoths to the reproductive success of *I. sessilis*, some features of the flowers also indicated sphingophily (Vogel 1969; Faegri and van der Pijl 1980). But indeed, both groups of animals perform legitimate visits on flowers and transport pollen among plants. Glossophaginae bats, however, may present territorial behavior, which favors geitonogamy and short-distance pollen flow (Gribel & Hay 1993). In this sense, assuming such a foraging behavior by bats in a self-incompatible species as *I. sessilis*, pollen transport could be limited impairing fruit production.

On the other side, despite the large number of hawkmoth species visiting and effectively carrying *I. sessilis* polyads, in general these insects visit many flowers in a single plant, limiting pollen flow among individuals. However, our analyses of the pollen load of the hawkmoth fauna collected at NSV (F.W. Amorim *et al.* unpublished data) indicated that some moth species, including *I. sessilis* visitors, can move over long distances in the Atlantic Rainforest. This analysis revealed that some hawkmoth species were carrying *Tocoyena bullata* Mart. (Rubiaceae) pollen, a species exclusive to coastal Restinga vegetation in the lowland forest, at least 15 km distant from the collection site. Hence, some hawkmoth species can transport pollen over long distances, which is more effective for fruit production of *Inga* species (Koptur 1984).

But if bats and hawkmoths are the most effective pollinators, why does *I. sessilis* produce nectar during the day, providing such an expensive floral reward to less effective pollinators? Based on the pollen tube growth analysis of stigmata from flowers exposed to both diurnal and nocturnal pollinators, we observed that they deposit polyads in more than 80% of *I. sessilis* flowers. Nonetheless, fruit production under natural conditions is about 5%, approximately the same percentage of the contribution of diurnal and nocturnal pollinators to the fruit set together. Moreover, when fruit

production is pollen limited (as in this case, limited by pollen quality) and the reliability of primary pollinators varies annually, selection favors more generalized pollination (Waser *et al.* 1996; Fleming *et al.* 2001). Thus hummingbirds act as important pollinators of *I. sessilis* as they seem to be more constant visitors, whereas bats and hawkmoths may be inconstant. In this sense, *I. sessilis* has a clear mixed and complementary pollination system, in which some pollinators are always available (Miyake & Yahara 1998; 1999; Wolff *et al.* 2003; Giménez-Benavides *et al.* 2007; Maruyama *et al.* 2010). In conclusion, the results presented in this study (*e.g.* nectar production pattern and changes in nectar sugar composition) support the occurrence of floral adaptation to different groups of pollinators beyond the flower morphology by itself, and the occurrence of generalist pollination systems as a successful evolutionary tendency.

REFERENCES

- Agostini K., Sazima M., Galetto L. (2011) Nectar production dynamics and sugar composition in two *Mucuna* species (Leguminosae, Faboideae) with different specialized pollinators. *Naturwissenschaften*, **98**, 933–942.
- Amorim F.W., Avila Jr., R.S., Camargo, J.A., Oliveira, P.E. (2009) A hawkmoth crossroads? Species richness, seasonality and biogeographical affinities of Sphingidae in a Brazilian Cerrado. *Journal of Biogeography*, **36**, 662–674.
- Armbruster W.S., Pélabon C., Hansen T.F., Mulder C.P.H. (2004) Floral integration and modularity: distinguishing complex adaptations from genetic constraints. In: Pigliucci M., Preston K.A. (Eds.), *The evolutionary biology of complex phenotypes*. Oxford University Press, Oxford, UK: 23–49.
- Armbruster W.S., Hansen T.F., Pélabon C., Pérez-Barrales R., Maad J. (2009) The adaptive accuracy of flowers: measurement and microevolutionary patterns. *Annals of Botany*, **103**, 1529–1545.
- Artz D.R., Villagra C.A., Raguso R.A. (2010) Spatiotemporal variation in the reproductive ecology of two parapatric subspecies of *Oenothera cespitosa* (Onagraceae). *American Journal of Botany*, **97**, 1498–1510.
- Baker H.G., Baker I. (1983) Floral nectar sugars constituents in relation to pollinator type. In: Jones C.E., Little R.J. (Eds.), *Handbook of experimental pollination biology*. New York: Van Nostrand Reinhold Co., EUA: 117–141.
- Bobrowiec P.E., Oliveira P.E. (2012) Removal effects on nectar production in bat-pollinated flowers of the Brazilian Cerrado. *Biotropica*, **44**, 1–5.
- Brunet J., Holmquist G.A. (2009) The influence of distinct pollinators on female and male reproductive success in the Rocky Mountain columbine. *Molecular Ecology*, **18**, 3745–3758.

- Bullock S.H. (1985) Breeding systems in the flora of a tropical deciduous forest in Mexico. *Biotropica*, **17**, 287–301.
- Burkle L.A., Alarcón R. (2011) The future of plant-pollinator diversity: understanding interaction networks across time, space, and global change. *American Journal of Botany*, **98**, 1–11.
- Buzato S., Sazima M., Sazima I. (2000) Hummingbird-pollinated floras at three Atlantic Forest sites. *Biotropica*, **32**, 824–841.
- Chalcoff V.R., Aizen M.A., Galetto L. (2006) Nectar concentration and composition of 26 species from the temperate forest of South America. *Annals of Botany*, **97**, 413–421.
- Collevatti R.G., Estolano R., Garcia S.F., Hay J.D. (2010) Short-distance pollen dispersal and high self-pollination in a bat-pollinated Neotropical tree. *Tree Genetics & Genomes*, **6**, 555–564.
- Cruden R.W. (1977) Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution*, **31**, 32–46.
- Cruz-Neto O., Lopes A.V., Machado I.C. (2007) Ecologia da polinização de *Inga striata* (Benth.) (Leguminosae–Mimosoideae) em um remanescente de Mata Atlântica no Nordeste do Brasil. *Revista Brasileira de Biociências*, **5**, 570–572.
- Cruz-Neto O., Machado I.C., Duarte Jr. J.A., Lopes, A.V. (2011) Synchronous phenology of hawkmoths (Sphingidae) and *Inga* species (Fabaceae–Mimosoideae): implications for the restoration of the Atlantic forest of northeastern Brazil. *Biodiversity and Conservation*, **20**, 751–765.
- Faegri K., van der Pijl L. (1980) *The principles of pollination ecology*. Pergamon Press, New York, NY, EUA.
- Feinsinger P. (1976) Organization of a tropical guild of nectarivorous birds. *Ecological Monographs*, **46**, 257–291.
- Fenster C.B., Armbruster W.S., Wilson P., Dudash M.R., Thomson J.D. (2004) Pollination syndromes and floral specialization. *Annual Review in Ecology, Evolution and Systematics*, **35**, 375–403.

- Fleming T.H., Sahley C.T., Holland J.N., Nason J.D., Hamrick J.L. (2001) Sonoran Desert columnar cacti and the evolution of generalized pollination systems. *Ecological Monographs*, **71**, 511–530.
- Fournier L.A. (1974) Un método cuantitativo para la medición de características fenológicas en árboles. *Turrialba*, **24**, 422–423.
- Freitas L., Sazima M. 2006 Pollination biology in a tropical high-altitude grassland in Brazil: interactions at the community level. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **93**, 465–516.
- Freitas L., Galetto L., Sazima M. (2006) Pollination by hummingbirds and bees in eight syntopic species and a putative hybrid of Ericaceae in Southeastern Brazil. *Plant Systematics and Evolution*, **258**, 49–61.
- Galetto L., Bernardello G. (2003) Nectar sugar composition in angiosperms from Chaco and Patagonia (Argentina): an animal visitor's matter? *Plant Systematics and Evolution*, **238**, 69– 86.
- Galetto L., Bernardello G. (2005) Nectar. In: Dafni A., Kevan P. (Eds.), *Pollination ecology: a practical approach*. Cambridge, Canada: 156–212.
- Gentry H.A. (1974) Flowering phenology and diversity in tropical Bignoniaceae. *Biotropica*, **6**, 64–68.
- Giménez-Benavides L., Dötterl S., Jürgens A., Escudero A., Iriondo J.M. (2007) Generalist diurnal pollination provides greater fitness in a plant with nocturnal pollination syndrome: assessing the effects of a *Silene-Hadena* interaction. *Oikos*, **116**, 1461–1472.
- Goyret J., Markwell P.M., Raguso R.A. (2008) Context- and scale-dependent effects of floral CO₂ on nectar foraging by *Manduca sexta*. *PNAS*, **105**, 4565–4570.
- Gribel R., Hay J.D. (1993) Pollination ecology of *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae) in Central Brazil cerrado vegetation. *Journal of Tropical Ecology*, **9**, 199–211.
- Guerenstein P.G., Christensen T.A., Hildebrand J.G. (2004a) Sensory processing of ambient CO₂ information in the brain of the moth *Manduca sexta*. *Journal of Comparative Physiology A*, **190**, 707–725.

- Guerenstein P.G., Yopez E.A., Van Haren J., Williams D.G., Hildebrand J.G. (2004b.) Floral CO₂ emission may indicate food abundance to nectar feeding moths. *Naturwissenschaften*, **91**, 329–333.
- Heinrich B. (1975) Energetics of pollination. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **6**, 139–170.
- Jennersten O., Morse D.H. (1991) The quality of pollination by diurnal and nocturnal insects visiting common milkweed, *Asclepias syriaca*. *American Midland Naturalist*, **125**, 18–28.
- Justino D.G., Maruyama P.K., Oliveira P.E. (2012) Floral resource availability and hummingbird territorial behavior on a Neotropical savanna shrub. *Journal of Ornithology*, **153**, 189–197.
- Kearns C.A., Inouye D.W. (1993) *Techniques for pollination biologists*. University Press of Colorado, Niwot, Colorado.
- Köppen W. (1948) *Climatologia: con un estudio de los climas de la tierra*. Fondo de Cultura Económica, México.
- Koptur S. (1983) Flowering phenology and floral biology of *Inga* (Fabaceae: Mimosoidae). *Systematic Botany*, **8**, 354–368.
- Koptur S. (1984) Outcrossing and pollinator limitation of fruit set: breeding systems of Neotropical *Inga* trees (Fabaceae: Mimosoidae). *Evolution*, **38**, 1130–1143.
- Koptur S. (1994) Floral and extrafloral nectars of Costa Rican *Inga* trees: a comparison of their constituents and composition. *Biotropica*, **26**, 276–284.
- Martin, F.W. (1959) Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. *Stain Technology*, **34**, 125–128.
- Maruyama P.K., Amorim F.W., Oliveira, P.E. (2010) Night and day service: distyly and mixed pollination system in *Faramea cyanea* (Rubiaceae). *Flora*, **205**, 818–824.
- Miyake T., Yahara T. (1998) Why does the flower of *Lonicera japonica* open at dusk? *Canadian Journal of Botany*, **76**, 1806–1811.

- Miyake T., Yahara T. (1999) Theoretical evaluation of pollen transfer by nocturnal and diurnal pollinators: when should a flower open? *Oikos*, **86**, 233–240.
- Morellato L.P.C., Talora D.C., Takahashi A., Bencke C.C., Romera E.C., Zipparro, V.B. (2000) Phenology of Atlantic Rain Forest trees: a comparative study. *Biotropica*, **32**, 811–823.
- Muchhala N., Caiza A., Vizúete J.C., Thomson J.D. (2009) A generalized pollination system in the tropics: bats, birds and *Aphelandra acanthus*. *Annals of Botany*, **103**, 1481–1487.
- Nepi M., Stpiczńska M. (2008) The complexity of nectar: secretion and resorption dynamically regulate features. *Naturwissenschaften*, **95**, 177–184.
- Newstrom L.E., Frankie G.W., Baker H.G. (1994) A new classification for plant phenology based on flowering patterns in lowland tropical rain forest trees at La Selva, Costa Rica. *Biotropica*, **26**, 141–159.
- Oliveira P.E., Gibbs P.E. (2000) Reproductive biology of wood plants in a Cerrado community of central Brazil. *Flora*, **195**, 311–329.
- Ollerton J., Alarcón R., Waser N.W., Price M. A., Watts S., Cranmer L., Hingston A., Peter C. I., Rotenberry J. (2009) A global test of the pollination syndrome hypothesis. *Annals of Botany*, **103**, 1471–1480.
- Ortega-Baes P., Saravia M., Sühring S., Godínez-Alvarez H., Zamar M. (2011) Reproductive biology of *Echinopsis terscheckii* (Cactaceae): the role of nocturnal and diurnal pollinators. *Plant Biology*, **13**, 33–40.
- Pennington T.D. (1997) *The genus Inga*. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Pleasant J.M. (1983) Nectar production patterns in *Ipomopsis aggregata* (Polemoniaceae). *American Journal of Botany*, **70**, 1468–1475.
- Proctor M., Yeo P., Lack A. (1996) *The natural history of pollination*. London: Harper Collins Publishers, UK.
- Pyke G.H. (1991) What does it cost a plant to produce floral nectar? *Nature*, **350**, 58–59.

- Sahli H.F., Conner J. K. (2011) Testing for conflicting and nonadditive selection: floral adaptation to multiple pollinators through male and female fitness. *Evolution*, **65**, 1457–1473.
- SanMartin-Gajardo I, Sazima M. (2005) Chiropterophily in Sinningieae (Gesneriaceae): *Sinningia brasiliensis* and *Paliavana prasinata* are bat-pollinated, but *P. sericiflora* is not. Not yet? *Annals of Botany*, **95**, 1097–1103.
- Sazima M., Sazima I., Buzato S. (1994) Nectar by day and night: *Siphocampylus sulfureus* (Lobeliaceae) pollinated by hummingbirds and bats. *Plant Systematics and Evolution*, **191**, 236–247.
- Sazima M., Buzato S., Sazima I. (1999) Bat-pollinated flower assemblages and bat visitors at two Atlantic Forest sites in Brazil. *Annals of Botany*, **83**, 705–712.
- Setzer J. (1966) *Atlas climatológico do estado de São Paulo*. Comissão Interestadual da Bacia do Paraná-Paraguai. CESP, São Paulo.
- Southwick E.E., Loper G.M., Sadwick S.E. (1981) Nectar production, composition, energetics and pollinator attractiveness in spring flowers of western New York. *American Journal of Botany*, **68**, 994–1000.
- Stebbins G.L. (1970) Adaptive radiation of reproductive characteristics in angiosperms, I: pollination mechanisms. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **1**, 307–326.
- Thom C., Guerenstein P.G., Mechaber W.L., Hildebrand J.G. (2004) Floral CO₂ reveals flower profitability to moths. *Journal of Chemical Ecology*, **30**, 1285–1288.
- Torres C., Galetto L. (1998) Patterns and implications of floral nectar secretion, chemical composition, removal effects, and standing crop in *Mandevilla pentlandiana* (Apocynaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, **127**, 207–223.
- Torres C., Galetto L. (2002) Are nectar sugar composition and corolla tube length related to the diversity of insects that visit Asteraceae flowers? *Plant Biology*, **4**, 360–366.

- Veloso H.P., Rangel-Filho A.L.R., Lima J.C.A. (1991) *Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal*. IBGE, Departamento de Recursos Naturais e Estudos Ambientais.
- Vogel S. (1969). Chiropterophilie in der neotropischen Flora. II. *Flora*, **158**, 185–350.
- Von Helversen O. (1993) Adaptation of flowers to pollination by Glossophagine bats. In: Barthlott W., Naumann C.M., Schmidt-Loske K., Schumann K.L. (Eds.), *Animal-plant interactions in tropical environments*. Bonn: Zoologisches Forschungsinstitut und Museum Alexander Koenig, Germany: 41–59.
- Walter H. (2010) Floral biology of *Echinopsis chiloensis* ssp. *chiloensis* (Cactaceae): evidence for a mixed pollination syndrome. *Flora*, **205**, 757–763.
- Waser N.M., Chittka L., Price M.V., Williams N.M., Ollerton J. (1996) Generalization in pollinations systems, and why it matters. *Ecology*, **77**, 1043–1060.
- Wolff D., Braun M., Liede S. (2003) Nocturnal versus diurnal pollination success in *Isertia laevis* (Rubiaceae): a sphingophilous plant visited by hummingbirds. *Plant Biology*, **5**, 71–78.
- Young H.J. (2002) Diurnal and nocturnal pollination of *Silene alba* (Caryophyllaceae). *American Journal of Botany*, **89**, 433–440.
- Zar J.H. (2010) *Biostatistical analysis*. 5th Edition. Prentice Hall, New Jersey, EUA.
- Zimmerman M., Pyke G.H. (1986) Reproduction in *Polemonium*: patterns and implications of floral nectar production and standing crops. *American Journal of Botany*, **73**, 1405–1415.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As interações entre plantas e polinizadores estão diretamente relacionadas com a estruturação e conservação das comunidades tropicais. Entretanto, poucos estudos têm trazido evidências sobre como processos ecológicos subjacentes às interações planta-polinizador interferem na organização dos ecossistemas. A abordagem adotada por este estudo, a qual engloba análises ao nível de comunidades (CAPÍTULO I, II), de populações (CAPÍTULO IV) e de espécies (CAPÍTULO III, V), possibilitou uma melhor compreensão acerca de alguns processos ecológicos relacionados às interações entre esfingídeos e plantas esfingófilas, os quais atuam no funcionamento da Floresta Ombrófila Densa Montana.

Como padrão geral para o sistema esfingídeos-plantas esfingófilas na região Neotropical foi verificada a ocorrência de ajustamento fenológico e morfológico nas distribuições de comprimento das probóscides dos polinizadores e dos tubos florais das plantas (CAPÍTULO I). Este padrão, por sua vez, parece ser resultante de dois processos distintos:

- 1) Processos locais de seleção mediada por polinizadores, os quais atuam no ajustamento da morfologia de flores e polinizadores entre distintos ecossistemas. Como evidência, nota-se a composição faunística similar de esfingídeos entre os ecossistemas, porém há mudança considerável na flora esfingófila associada. Sendo que, em populações nas quais os polinizadores possuem aparelhos bucais com dimensões equivalentes aos tubos florais das plantas exploradas, a seleção mediada por polinizadores opera sobre a morfologia floral (CAPÍTULO IV).
- 2) Partição de recursos por estratégia de forrageamento ótimo, o qual atua no ajustamento fenológico entre esfingídeos e plantas. Como evidência nota-se que a proporção de espécies e indivíduos de mariposas com longas probóscides é muito baixa em relação ao grupo de

mariposas com probóscides curtas (**CAPÍTULO II**). Além de menos abundantes, mariposas com longas probóscides requerem mais energia e sua ocorrência sazonal é coincidente com a floração de espécies com tubos florais longos (**CAPÍTULO II**), as quais oferecem maior quantidade de néctar acessível apenas aos polinizadores com longos aparelhos bucais (**CAPÍTULO I**).

A especialização em polinizadores menos abundantes cujas populações variam espaço-temporalmente, como esfingídeos com longas probóscides, tem como consequência direta a limitação do sucesso reprodutivo em espécies esfingófilas altamente especializadas (**CAPÍTULO III**). Este grupo de plantas, por sua vez, possui mecanismos de polinização muito complexos de forma a otimizar o transporte de pólen pelos polinizadores. Porém, o desajuste espaço-temporal entre as morfologias das plantas e dos polinizadores, tem consequências diretas sobre os processos de seleção mediada por polinizadores sobre a morfologia da flor (**CAPÍTULO IV**).

Em outro extremo, nota-se que sistemas de polinização generalistas envolvem um conjunto de características, que vão além da morfologia floral, que possibilitam atender às necessidades de distintos grupos de polinizadores de forma a favorecer a constância no serviço de polinização (**CAPÍTULO V**). Uma vez que, em espécies autoincompatíveis, as flutuações espaço-temporais de polinizadores podem trazer consequências dramáticas para a reprodução, diversidade genética e dinâmica populacional.

Nos casos mencionados acima, as dinâmicas espaço-temporais das populações de esfingídeos parecem afetar sobremaneira os processos ecológicos subjacentes às interações planta-polinizador. A presença de uma espécie estritamente esfingófila com distribuição restrita a uma fisionomia florestal da Mata Atlântica, como a floresta de Restinga, foi imprescindível para compreender o fluxo de esfingídeos entre distintos ecossistemas da Mata Atlântica, utilizando o pólen como um marcador confiável. Este achado permite inferir que, ao menos em parte, que os distintos ecossistemas que compõem a Mata Atlântica funcionam como uma unidade ecológica. Consequentemente, a manutenção

de processos ecológicos importantes para o funcionamento do bioma está diretamente dependente da conectividade entre áreas e da conservação do pouco que ainda resta de Mata Atlântica no Brasil.