



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de Botucatu

Trabalho de Conclusão de Curso

Seleção natural mediada por polinizadores em uma espécie especializada de Cerrado: comparação entre ambientes contrastantes no Centro-Oeste Paulista

Bruno Blumer de Castro
Discente

Prof. Dr. Felipe W. Amorim
Orientador - Brasil

Prof. Dr. Santiago B. Vieyra
Supervisor – Argentina
Iniciação Científica e Tecnológica no Exterior - ICTEx

BOTUCATU – SP
2025

Bruno Blumer de Castro

Seleção natural mediada por polinizadores em uma espécie especializada de Cerrado: comparação entre ambientes contrastantes no Centro-Oeste Paulista

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado a Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências de Botucatu, como parte das exigências para obtenção do título de Bacharelado do curso de Graduação em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr.
Felipe Wanderley Amorim

Botucatu
2025

B658s

Blumer, Bruno Blumer de Castro

Seleção natural mediada por polinizadores em uma espécie especializada de Cerrado : comparação entre ambientes contrastantes no Centro-Oeste Paulista

/ Bruno Blumer de Castro Blumer. -- Botucatu, 2025

29 p. : il., tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu

Orientador: Felipe Wanderley Amorim

1. Ciências da vida. 2. Ecologia. 3. Polinização. 4. Seleção natural. 5. Esfingofilia. I. Título.

Bruno Blumer de Castro

Seleção natural mediada por polinizadores em uma espécie especializada de Cerrado: comparação entre ambientes contrastantes no Centro-Oeste Paulista

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado a Universidade Estadual Paulista (UNESP), como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel, do curso de Graduação em Ciências Biológicas.

Botucatu, 14 de julho de 2025.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Felipe W. Amorim
Departamento de Biodiversidade e Bioestatística
Instituto de Biociências
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Campus de Botucatu

Dr. Caio Simões Ballarin
Departamento de Biodiversidade e Bioestatística
Instituto de Biociências
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Campus de Botucatu

Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente ao PIBIC e a Pró-Reitoria pelo fomento para a realização do trabalho e a AREX em parceria com a PROPe pelo fomento e oportunidade de realização de um estágio e um projeto de iniciação científica no exterior.

Também agradeço ao meu orientador, o Prof. Dr. Felipe W. Amorim que me apresentou à ecologia da polinização com uma perspectiva diferente sendo na evolução das interações planta-polinizador, seleção fenotípica e muitas outras perspectivas; as quais seguirei carreira com.

Agradeço meu supervisor durante o breve e produtivo estágio na argentina, o Dr. Santiago Benitez-Vieyra por me receber de braços abertos no Instituto Multidisciplinar de Biologia Vegetal (IMBIV) / Laboratório de Ecologia Evolutiva e biologia floral, além de me apresentar a tantos outros pesquisadores.

Agradeço profundamente à minha família pelo amor, apoio incondicional e por sempre acreditarem em mim ao longo desta jornada. Sua presença constante foi essencial nos momentos mais desafiadores e nas conquistas que marcaram meu percurso acadêmico.

Agradeço a minha companheira pelo incentivo, paciência e compreensão diante das exigências deste processo. Seu apoio emocional e intelectual foi fundamental para que eu pudesse seguir com serenidade e determinação.

Por fim, aos membros do LEPI (laboratório de ecologia da polinização e interações) que me ajudaram em cada passo desse trabalho e na mudança de rumo de carreira acadêmica que fiz no ano de 2023 para a área da ecologia, evolução e ecologia da polinização e os membros do IMBIV por me receberem tão amigavelmente e contribuírem tanto para meu crescimento e formação acadêmica.

Resumo

A seleção natural mediada por polinizadores ocorre quando fenótipos florais específicos e herdáveis aumentam o sucesso reprodutivo das plantas devido às interações e pressões seletivas diferenciais causadas por seus polinizadores. Sendo assim, promovendo adaptações morfológicas para maior eficiência na polinização. Apesar destas adaptações conferirem um grau de especialização, interações planta-polinizador frequentemente apresentam assimetrias, organizando-se em redes complexas influenciadas por fatores bióticos e abióticos. Em espécies de ampla distribuição, essas interações geram mosaicos geográficos de atributos fenotípicos e variabilidade local ajustada à fauna de polinizadores. *Tocoyena formosa* (Rubiaceae), amplamente distribuída no Cerrado, exemplifica esse fenômeno. Suas flores tubulares são altamente especializadas para a polinização por mariposas do grupo dos esfingídeos com probóscides longas, sendo dependente exclusivamente dessas espécies devido à sua autoincompatibilidade. Entretanto, apenas uma pequena fração da fauna de esfingídeos do Cerrado possui probóscides longas, o que reforça a importância dessas mariposas na manutenção e conectividade ecológica nas comunidades. Caracterizamos a fauna de polinizadores de *T. formosa* presente na Estação Ecológica Barreiro Rico (EBR) por meio de observações diretas e indiretas com ferramentas como câmeras trap e de visão noturna além de redes entomológicas. Nas plantas, o comprimento do tubo floral, área da corola e número de flores foram medidos como atributos morfológicos associados à interação com polinizadores. O sucesso reprodutivo foi medido primariamente pelo número de frutos formados e média de sementes por fruto. Posteriormente, com o objetivo de aprofundar o trabalho, o êxito reprodutivo feminino foi mensurado por meio de medidas proporcionais entre o número de frutos produzidos pelo número de flores total de cada indivíduo. Os dados da população de EBR foram comparados com outras populações previamente estudadas em diversas regiões do Cerrado brasileiro. A seleção natural foi investigada por regressões múltiplas e modelos aditivos generalizados, usando abordagens clássicas e atualizadas, permitindo estimar a força, direção e forma da seleção natural sobre os atributos medidos. Este trabalho integrou dados das morfologias florais e êxito reprodutivo feminino de outra população de *T. formosa* previamente estudada para entender padrões geográficos de seleção mediada por polinizadores. Para tal, utilizando dos mesmos moldes deste trabalho, uma população de *T. formosa* presente na região de Pratânia (PRT), que ocorria em um cerrado mais comum, foi analisada e comparada com as descobertas feitas em EBR. Os resultados indicam que a população de *T. formosa* na Estação Ecológica de Barreiro Rico (EBR) apresenta uma fauna de polinizadores composta por três espécies de esfingídeos interagindo com a planta: *Agrius cingulata*, *Manduca rustica* e *Manduca paphus*. A população de EBR possui tubos florais significativamente mais longos do que as populações de Pratânia e Caldas Novas. Observou-se também que os polinizadores apresentam um forte ajuste morfológico com as flores na comunidade de EBR. Devido a isso, foram observados gradientes significativos para um maior número de flores no *display* floral, o que aumentaria a atração de polinizadores e a frequência de visitas. Portanto, o sucesso reprodutivo da população presente em EBR é favorecido pela produção de mais flores, conferindo maior *display* floral e atração de polinizadores. Com o objetivo de aprofundar o trabalho, novas análises de seleção foram feitas utilizando diferentes formas para quantificar o êxito reprodutivo da população presente em EBR, que acabaram confirmando os resultados encontrados até então. Nossos resultados também mostraram que as distintas comunidades formadas de populações de *Tocoyena formosa* e seus polinizadores presentes em Barreiro Rico e Pratânia, apresentam diferenças bióticas e abióticas entre si que levam a alterações formalmente significantes na atuação da seleção natural mediada por polinizadores nestas microescalas. Em relação a Pratânia, a população está sendo selecionada para ter tubos florais mais longos dada o fraco ajuste morfológico planta-polinizador e os tubos significativamente mais curtos. Portanto, em cada caso, a seleção natural acaba selecionando diferentes atributos florais com base nas diferenças abióticas e pressões resultantes dos diferentes graus de ajuste morfológicos da miríade de interações causadas por seus polinizadores e morfologias florais existentes nas diferentes populações formando um mosaico Co evolutivo complexo.

Palavras-chave: Seleção mediada por polinizadores, atributos morfológicos, *Tocoyena formosa*, esfingofilia, mosaico.

Abstract

Pollinator-mediated natural selection occurs when specific and heritable floral phenotypes increase the reproductive success of plants due to interactions and differential selective pressures exerted by their pollinators, thus promoting morphological adaptations for greater pollination efficiency. Although these adaptations confer a certain degree of specialization. Plant-pollinator interactions often present asymmetries, organizing themselves into complex networks influenced by biotic and abiotic factors. In widely distributed species, such interactions generate geographic mosaics of phenotypic traits and local variability adjusted to the pollinator fauna. *Tocoyena formosa* (Rubiaceae), widely distributed in the Cerrado biome, exemplifies this phenomenon. Its tubular flowers are highly specialized for pollination by sphingid moths with long proboscises, being exclusively dependent on these species due to its self-incompatibility. However, only a small fraction of the Cerrado's sphingid fauna has long proboscises, which reinforces the importance of these moths in maintaining ecological connectivity in the communities. We characterized the pollinator fauna of *T. formosa* at the Barreiro Rico Ecological Station (EBR) through direct and indirect observations using tools such as camera traps, night vision equipment, and entomological nets. In the plants, floral tube length, corolla area, and flower number were measured as morphological traits associated with pollinator interaction. Reproductive success was primarily measured by the number of fruits produced and the average number of seeds per fruit. To further deepen the study, female reproductive success was also quantified by the proportion between the number of fruits produced and the total number of flowers per individual. Data from the EBR population were compared with other previously studied populations from different regions of the Brazilian Cerrado. Natural selection was investigated using multiple regressions and generalized additive models, applying classical and updated approaches to estimate the strength, direction, and form of natural selection on the measured traits. This study integrated floral morphology and female reproductive success data from another previously studied population of *T. formosa* to understand geographic patterns of pollinator-mediated selection. To this end, using the same methodology, a population of *T. formosa* from the Pratânia region (PRT), occurring in a more typical Cerrado, was analyzed and compared with the findings from EBR. The results indicate that the *T. formosa* population at Barreiro Rico Ecological Station (EBR) has a pollinator fauna composed of three sphingid species interacting with the plant: *Agrius cingulata*, *Manduca rustica*, and *Manduca paphus*. The EBR population has significantly longer floral tubes than the populations from Pratânia and Caldas Novas. A strong morphological match between pollinators and flowers was also observed in the EBR community. Consequently, significant gradients were observed for a larger floral display, which would increase pollinator attraction and visitation frequency. Therefore, the reproductive success of the EBR population is favored by the production of more flowers, providing a greater floral display and attracting more pollinators. To deepen the study, new selection analyses were conducted using different approaches to quantify the reproductive success of the EBR population, which confirmed the results found so far. Our results also showed that the distinct communities formed by *Tocoyena formosa* populations and their pollinators in Barreiro Rico and Pratânia present biotic and abiotic differences that lead to significant changes in the action of pollinator-mediated natural selection at these micro-scales. In Pratânia, the population is being selected for longer floral tubes given the weak morphological fit between plants and pollinators and the significantly shorter tubes. Therefore, in each case, natural selection favors different floral traits based on abiotic differences and the resulting pressures from the varying degrees of morphological fit in the myriad of interactions caused by their pollinators and the floral morphologies present in different populations, forming a complex coevolutionary mosaic.

Keywords: Pollinator-mediated selection, morphological traits, *Tocoyena formosa*, sphingophily, mosaic.

Sumário

Resumo	2
Abstract.....	3
1. Introdução	5
2. Objetivos	9
3. Materiais e Métodos	9
4. Resultados	13
5. Discussão	19
6. Conclusões	22
7. Referências	23

1. Introdução

A seleção natural mediada por polinizadores (SNMP) ocorre quando o sucesso reprodutivo dos indivíduos em uma população de planta aumenta em função de determinados fenótipos florais herdáveis que, por meio das interações e pressões seletivas exercidas pelos polinizadores, maximizam a eficiência da polinização e o sucesso reprodutivo dos indivíduos (Simón-Porcar et al., 2024; Amorim et al., 2022; Rech et al., 2014; Bartkowska & Johnston, 2012; Stebbins 1970). Assim sendo, as interações planta-polinizador podem resultar em adaptações muito estreitas, como tubos longos para probóscides longas; conferindo à interação um certo grau de especialização para um grupo de polinizadores (Tong et al., 2024; Pauw et al., 2009; Grindeland et al., 2005). Fortes ajustes morfológicos planta-polinizador, elevam o êxito reprodutivo das plantas e conferem vantagens para seus polinizadores, como acesso exclusivo e total aos recursos produzidos nas flores, resultando em uma fidelidade floral elevada (Solís & Vallejo, 2017; Sazatornil et al., 2016; Moré et al., 2012).

Entretanto, como os mutualismos permitem a ocorrência de um amplo espectro de ajustes e desajustes entre as espécies, espera-se que o nível de reciprocidade morfológica seja variável através do tempo e de suas distribuições (Soteras et al., 2020; Sazatornil et al., 2016; Thompson, 2005). Isso ocorre porque, uma vez que, plantas e polinizadores estabelecem interações assimétricas que estão organizadas em redes complexas, nas quais cada população pode evoluir diferentemente. Estas assimetrias, por sua vez, ocorrem devido às interações com outras espécies e às variações nas condições abióticas ao longo de suas distribuições e ao longo do tempo. Sendo assim, criando mosaicos geográficos de atributos. (Soteras et al., 2020; Pauw et al., 2009; Anderson & Johnson, 2008; Thompson, 2005). Ademais, estas assimetrias ocorrem mesmo em sistemas altamente especializados e afetam especialmente as espécies com ampla distribuição geográfica, que por sua vez, tendem a apresentar mudanças micro evolutivas via seleção natural local as quais tornam a morfologia das flores localmente ajustada aos polinizadores (Sazatornil et al., 2016; Moré et al., 2012; Anderson & Johnson, 2008).

Exemplos de adaptações em resposta as diferentes interações com animais são o desenvolvimento de flores tubulares e modulações no *display* floral (Sletvold et al., 2017; Nilsson, 1988; Mitchell et al., 2004). Estes atributos florais podem adquirir diversos papéis nas interações ecológicas. O papel do tubo floral na interação está relacionado com

a limitação na identidade das interações e na mediação no acesso aos recursos. Sua modulação pode favorecer o ajuste morfológico planta-animal maximizando a eficiência dessa interação (Solís & Vallejo, 2017). Já o *display* floral, além de também ser associado com o ajuste morfológico planta-polinizador, é composto por elementos atrativos como número de flores, cores e fragrâncias, desempenha papel fundamental na atração de polinizadores (Amorim et al., 2022; Kindlmann et al., 2006). Dessa forma, variações no número de flores, por exemplo, tem efeito direto no sucesso reprodutivo das espécies. Mas também, é um importante modulador da interação, podendo influenciar na frequência e nos padrões de visita resultando na modulação da exportação e recepção de pólen (Benitez-Vieyra et al., 2005; Grindeland et al., 2005; Mitchell et al., 2004).

Partindo destes pressupostos, espécies com ampla distribuição e variação fenotípica são bons modelos para avaliar como o processo de seleção pode variar em microescalas. *Tocoyena formosa* (Rubiaceae) é uma das espécies lenhosas mais comuns e amplamente distribuídas no Cerrado (Sanz-Veiga et al., 2021; Ratter et al., 2003). Suas flores possuem cores claras variando de branco a amarelo claro e apresentam tubos hipocrateriformes cujo comprimento pode ser superior a 15 cm. A antese é exclusivamente noturna, período no qual ocorre a emissão de um odor adocicado, além da produção do néctar (Oliveira et al., 2004). Estas características tornam *T. formosa* uma das plantas de Cerrado estritamente especializadas a polinização por esfingídeos (veja Silberbauer-Gottsberger, 1972; Silberbauer-Gottsberger & Gottsberger, 1975; Oliveira et al., 2004; Sanz-Veiga et al., 2021).

Ademais, além de apresentar elevada especialização fenotípica, *T. formosa* também é uma espécie auto incompatível (ou seja, depende exclusivamente de polinização cruzada para a produção de frutos e sementes) e possui flores protândricas (ou seja, amadurecimento primário da fase masculina e secundário da feminina), levando a uma redução na probabilidade de o estigma receber por grãos de pólen advindos do mesmo indivíduo. Este conjunto de características torna a espécie completamente dependente dos esfingídeos para a sua reprodução, particularmente aquelas espécies com probóscide longa. Contudo, espécies de esfingídeos com probóscide longa (>8,0 cm) constituem apenas uma pequena fração (~1/3) da fauna dessa família no Cerrado (Camargo et al., 2018; Amorim et al., 2009), bem como em outros em ecossistemas tropicais no planeta (Johnson et al., 2017).

Os esfingídeos (Lepidoptera, Sphingidae) são mariposas muito peculiares, reconhecidas pelo seu papel duplo como polinizadores noturnos e em sua fase larval, herbívoros vorazes e economicamente relevantes. Na fase adulta, esses animais são conhecidos por se alimentarem nesta fase, serem longevos, possuírem uma grande capacidade de dispersão, possuírem uma alta demanda de recursos diariamente (chegando a até um terço do peso corpóreo por dia) e uma elevada fidelidade floral promovendo a reprodução sexuada de muitas espécies vegetais com morfologia floral bastante especializada (Oliveira et al., 2014; Darwin, 1862; Wallace, 1867).

Apesar da esfingofilia não ser o sistema de polinização mais frequente, a adaptação para a polinização por esfingídeos em uma grande diversidade de plantas torna este sistema de polinização fundamental para a estrutura e organização de comunidades, haja vista que várias espécies de plantas dependem exclusivamente destes polinizadores para que ocorra a polinização e reprodução (Amorim et al., 2009; Johnson et al., 2017). Estes animais acabam por serem excelentes conectores de populações e biomas enquanto buscam por recursos ao longo do decorrer das estações do ano e ao longo de suas distribuições (Krissa et al., 2019; Amorim et al., 2009; Beck & Kitching, 2007). Ademais, considerando que existem flores esfingófilas em todos os biomas brasileiros, ocupando grandes extensões e atravessando diversos biomas (Camargo et al., 2018; Johnson et al., 2017; Oliveira et al., 2014). E que o cerrado faz fronteira com grandes biomas brasileiros (ou seja, Mata atlântica, Amazônia, Pantanal e Caatinga). Então, a localização geográfica do Cerrado permite que esse ecossistema funcione como uma matriz permeável para entrada de espécies providas dos ecossistemas adjacentes, o que influencia diretamente a composição de espécies da fauna de esfingídeos no bioma (Amorim et al., 2009).

Estas características geram variações locais na fauna dessas mariposas (a qual apresenta elevada diversidade β , ou seja, turnover de espécies) e possuem flutuações faunísticas interanuais podendo afetar a evolução da morfologia floral de plantas especializadas e com ampla distribuição, como é o caso de *Tocoyena formosa* (Vellend, 2010; Amorim et al., 2009). Portanto, a *T. formosa* é uma excelente espécie modelo para entender as variações geográficas na reciprocidade morfológica de uma população e seus polinizadores, mais também, como a seleção natural mediada por polinizadores sob caracteres fenotípicos possa estar atuando ao longo de sua distribuição no extenso Cerrado brasileiro. Estes animais acabam por serem excelentes conectores de populações e biomas enquanto buscam por recursos ao longo do decorrer das estações do ano e ao

longo de suas distribuições (Krissa et al., 2019; Amorim et al., 2009; Beck & Kitching, 2007).

No centro-oeste paulista, na porção mais ao sul da distribuição do Cerrado e regiões de florestas estacionais semidecíduais da Mata Atlântica fazem fronteira e levam a ocorrência de importantes áreas de transição de biomas. Ambos os biomas possuem grande importância como hotspots prioritários para conservação no Brasil (Myers et al., 2000). Uma dessas zonas de transição ocorre na região de Botucatu e Anhembi; e especificamente na Estação Ecológica Barreiro Rico (EBR), município de Anhembi - SP, uma parte dessa zona ocorre uma condição muito particular, na qual é possível observar um enclave de Cerrado *sensu stricto* circundado por floresta estacional semidecidual. Nesta área, encontramos uma população de *T. formosa* já em fase de frutificação (março de 2023), o que revela a atividade de esfingídeos. E, considerando que a região é uma zona de transição de biomas, a EBR tem um grande potencial de possuir um elevado turnover de espécies (elevada beta diversidade) o que possibilitaria novas interações entre espécies dos dois biomas com *T. formosa*. Estas condições podem resultar em diferenças no *pool* de espécies de esfingídeos, diferenças nos atributos fenotípicos e prováveis mudanças na atuação da seleção natural mediada por polinizadores em relação a outras populações que ocorrem em cenários mais típicos de Cerrado.

Entretanto, não conhecemos quais nem quantas espécies de esfingídeos visitam as flores de *T. formosa* nesse enclave de Cerrado, tampouco se há uma variação em sua morfologia floral em relação a outras populações de *T. formosa* no Brasil, e se a morfologia floral da população está sujeita a processos locais de seleção natural mediada pelos polinizadores. Dessa forma, se torna imprescindível investigar a diversidade de esfingídeos que interagem com as flores de *T. formosa* nesse enclave de Cerrado e compará-las com as de outras populações, assim como testar a variação em sua morfologia floral em relação a outras populações de *T. formosa* no Brasil, e se a morfologia floral da população está sujeita a processos locais de seleção natural mediada pelos polinizadores.

2. Objetivos

Considerando que *i*) a fauna de esfingídeos do Cerrado é influenciada pela da fauna provinda dos biomas adjacentes; *ii*) a área de estudo é um enclave de Cerrado circundado por floresta estacional semidecidual; *iii*) *T. formosa* é uma espécie completamente dependente de esfingídeos para a sua polinização. Espera-se que variações na fauna de polinizadores possam implicar em variações no regime de pressão seletivas que atuam na morfologia da flor e no *display* floral. Então o presente trabalho tem como objetivos:

- 1) Identificar a composição de espécies de esfingídeos polinizadores de *T. formosa* no enclave de Cerrado e avaliar se ela difere daquela observada em outras áreas de Cerrado no Brasil.
- 2) Analisar se a distribuição do comprimento do tubo floral de *T. formosa* difere de outras áreas previamente estudadas ao longo de sua distribuição no Cerrado.
- 3) Testar a ocorrência de seleção natural mediada por polinizadores sobre a morfologia floral desta população de *T. formosa* que está presente nesta área de Cerrado.
- 4) Testar se a atuação da seleção natural mediada por polinizadores difere entre populações previamente estudadas utilizando diversos métodos para quantificar o êxito reprodutivo de *Tocoyena formosa*.

3. Materiais e Métodos

ÁREA DE ESTUDO: O estudo foi desenvolvido na Estação Ecológica Barreiro Rico – EBR (22°40'32" S – 48°08'34" W), situada no município de Anhembi entre os Rios Tietê (ao sul) e Piracicaba (ao norte), a uma altitude de *ca.* 500 m *a.n.m.* A EBR possui uma área total de 292 Hectares, composta em sua maior parte por floresta estacional semidecidual (Mata Atlântica), que circunda um pequeno enclave de Cerrado *sensu stricto* com cerca de 6 Hectares. Neste enclave, ocorrem espécies muito típicas deste ecossistema, tal como *T. formosa*, que representa uma das espécies mais amplamente distribuídas do Cerrado (Ratter et al.; 2003). O estudo de campo foi realizado

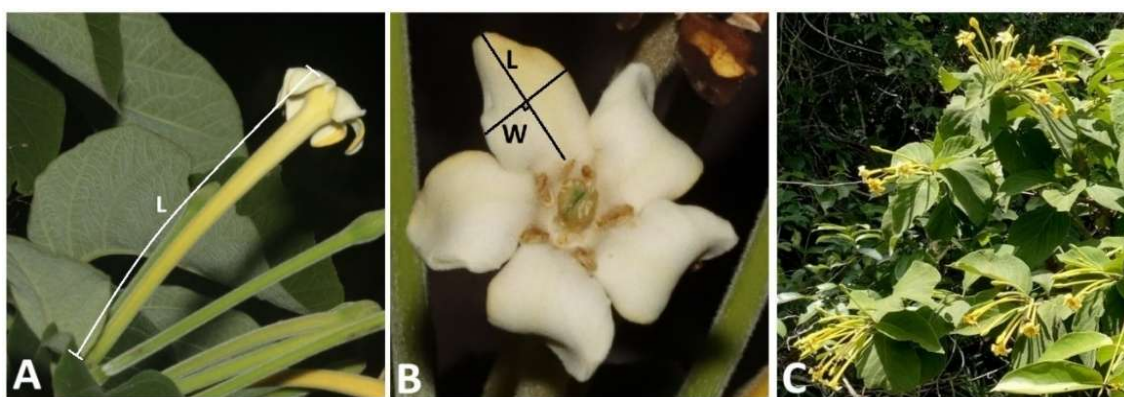
entre outubro de 2023 e março de 2024, o que compreende todo o período reprodutivo (da floração à frutificação) de *T. formosa*.

CARACTERIZAÇÃO DA FAUNA DE ESFINGÍDEOS POLINIZADORES: A caracterização da fauna de polinizadores foi realizada por meio de observações focais dos visitantes florais de *T. formosa*, através da captura direta de imagens e mariposas visitando flores utilizando câmeras fotográficas e redes entomológicas. Para tal, a presença dos visitantes nas flores foi identificada com o auxílio de binóculo e câmera com visão noturna (luz IR), o que permite a observação dos esfingídeos na completa ausência de luz. Adicionalmente, também foi realizada a observação indireta dos visitantes florais de *T. formosa* por meio do uso de três câmeras de visão noturna ativadas por calor e movimento (Bushnell Corporation, Overland Park, Kansas). Estas câmeras utilizam detecção de infravermelho passivo (*passive-infrared detection*), e permitem a realização de observações acuradas dos visitantes florais ao longo de todo o período de floração da espécie e, portanto, da quantificação da frequência de visitas (veja Jonhson et al., 2020; Amorim et al., 2022). Todas as espécies capturadas tiveram o comprimento de sua probóscide aferida com auxílio de paquímetro digital, além de analisadas para a presença de pólen de *T. formosa*, cuja morfologia é bastante característica e facilmente distinguida de outras espécies vegetais visitadas por esfingídeos. As identificações das espécies de esfingídeos foram realizadas conforme Camargo et al. (2018).

CARACTERIZAÇÃO DA MORFOLOGIA FLORAL E SELEÇÃO NATURAL MEDIADA POR POLINIZADORES: Para caracterizar a morfologia floral da população de *T. formosa*, nós marcamos 44 indivíduos com pelo menos 5 flores na área de estudo, dos quais fizemos medidas de 5 a 10 flores por planta (N de flores totais = 240). Como o tubo floral representa o atributo limitante mais importante relacionado à interação da *T. formosa* e os esfingídeos, o comprimento do tubo foi o atributo morfológico alvo da investigação da seleção natural mediada por polinizadores. Para aferir o comprimento do tubo floral foi utilizado paquímetro digital (Figura 1 em A). Ademais, foram coletados também dados relativos à área da pétala excluindo o comprimento do tubo floral (considerada uma elipse, Figura 1 em B) e dados relativos ao número total de flores produzidas por indivíduo estudado (Figura 1 em C).

Como as análises de seleção natural dependem de um parâmetro de *fitness*, nós utilizaremos o êxito reprodutivo feminino (*ERF*) para testar a ocorrência de seleção

natural mediada pelos polinizadores sobre os atributos florais via componente materno do *fitness*. Para aferir o *ERF* foram: Quantificados o número de frutos iniciados totais dos indivíduos; considerando que para haver formação de frutos, necessariamente, deve haver a polinização/fecundação cruzada nessa espécie, foi quantificado a média de sementes produzidas por fruto de cada indivíduo (pelo menos 3 frutos quantificados), foi calculado a proporção de frutos iniciados pelo número de flores produzidas totais e por fim, foi calculado a média de sementes multiplicada pela quantidade de frutos totais dividido pelo número de flores produzidas totais. Assim, a ocorrência de *SNMP* sobre os atributos desta espécie foi testada a partir da relação entre os atributos preditores e os diferentes métodos para quantificar o êxito reprodutivo como Proxys resposta. A mesma metodologia de



coleta de dados foi aplicada nas populações utilizadas neste trabalho que foram previamente estudadas pelo Laboratório de Ecologia da Polinização e Interações (LEPI).

Figura 1. Atributos florais contabilizados. Em A. comprimento do tubo floral. Em B. área da pétala da corola excluindo o tubo floral (considerada uma elipse, L=comprimento, W=largura). Em C. número total de flores por indivíduo.

ANÁLISE DE DADOS: Para testar se o comprimento do tubo floral da população difere daquele observado em outras populações no Brasil foi realizada uma ANOVA de um fator. Para estas análises foram utilizados os dados de pelo menos cinco populações distintas, cujos dados morfológicos foram aferidos nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Goiás e Tocantins (os outros dados são de trabalhos não publicados realizados pelo grupo de estudos). As análises de seleção natural mediada pelos polinizadores foram executadas segundo as abordagens clássica de Lande & Arnold (1983) e a mais atual de Morrissey & Sakrejda (2013); com o modelo: Núm. frutos ~ Tubo floral + Área corola + Núm. Flores (atributos estandardizados e *fitness* relativizado). Sendo assim, foram utilizadas regressões múltiplas e modelos aditivos generalizados para estimar a força, forma e direção da seleção natural mediada pelos polinizadores operando

sobre os atributos morfológicos medidos (através dos valores e significâncias dos gradientes de seleção). Utilizando a linguagem de programação R (R Core Team, 2023-04-21) para realizar todas as análises, extrair os diferenciais e gradientes de seleção e por fim, construir os gráficos dos resultados das análises e dados (pacotes utilizados: ggplot2, car, ggfortify, visreg, mgcv, gsg, emmeans).

Utilizando de dados e resultados não publicados de outros trabalhos pertencentes ao grupo de pesquisa do Laboratório de Ecologia da Polinização e Interações (LEPI), relativos as mesmas análises propostas no presente trabalho, comparamos nossos resultados em relação a composição da fauna de polinizadores e distribuição dos caracteres morfológicos das populações entre a população de EBR e de outras populações de *T. formosa* ao longo da distribuição do cerrado brasileiro para entender a distribuição dos caracteres mensurados, bem como possíveis diferenças, entre as populações.

Também, a partir das primeiras análises do presente trabalho e por meio dos dados coletados em uma população localizada no município de Pratânia, refizemos as análises de seleção mediada por polinizadores nos moldes do presente trabalho, utilizando, em parte, os mesmos métodos para quantificar o êxito reprodutivo da espécie sendo o número de frutos iniciados (proxy0) e a proporção de frutos iniciados por flor formada (proxy1). Por fim, para comparar a atuação da seleção natural mediada por polinizadores entre as populações de EBR e PRT foram construídos diferentes modelos GAM relacionando o sucesso reprodutivo, isto é, os métodos de quantificação quantificados e calculados, com os atributos florais foram comparados em diferentes níveis de complexidade. Estes níveis de complexidade levavam em conta os dados recolhidos como pertencentes de diferentes populações, em diferentes níveis de separação e como pertencentes a mesma população.

4. Resultados

FAUNA DE POLINIZADORES: Três espécies principais de esfingídeos visitantes desta população de *T. formosa* foram identificadas e suas probóscides mensuradas (Figura 2), sendo em média: *Agrius cingulata* (probóscide:~9cm), *Manduca rustica* (probóscide:~13cm) e *Manduca paphus* (probóscide:~10cm) Nas outras populações, previamente estudadas pelos membros do LEPI, estas espécies ocorreram em todas as populações concomitantemente com mais outras espécies de esfingídeos.

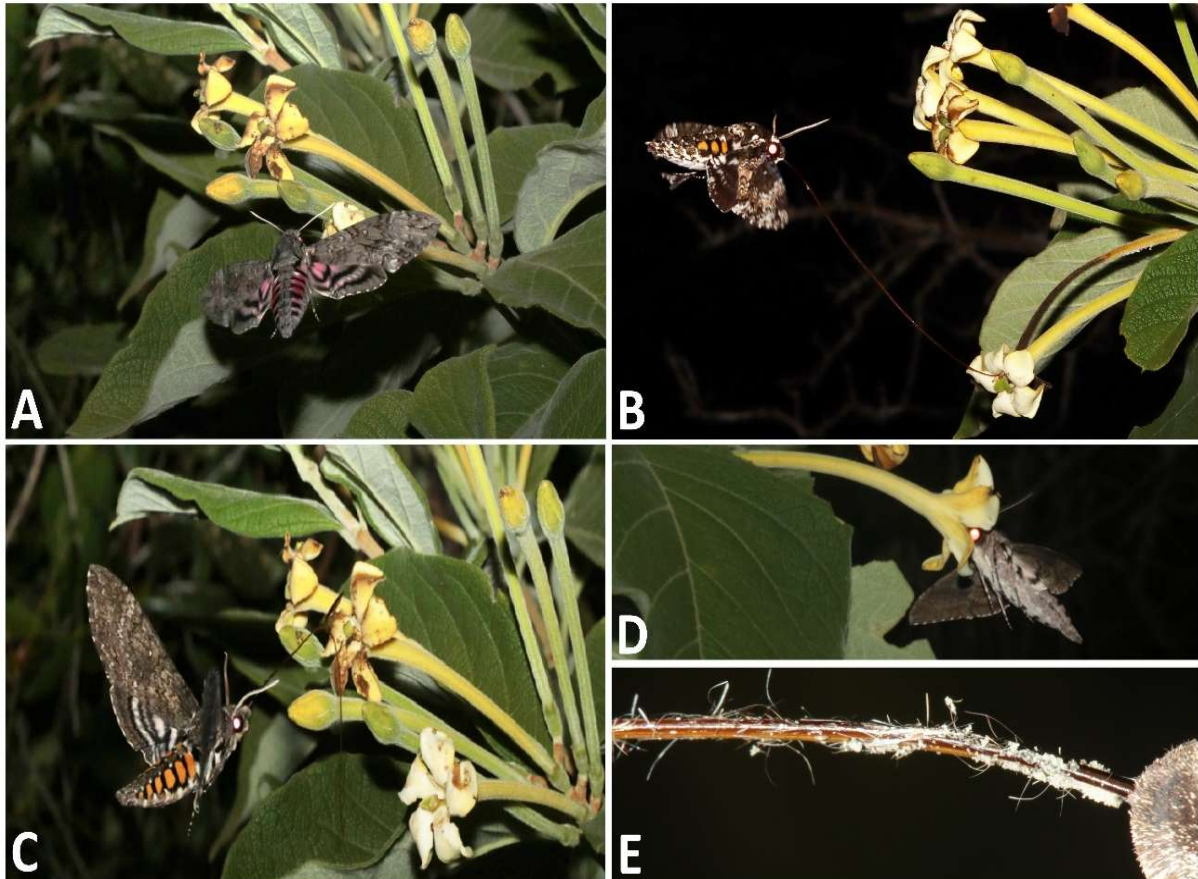


Figura 2. Principais espécies polinizadoras da população de *Tocoyena formosa* pertencente à Estação Ecológica de Barreiro Rico. Em A, *Agrius cingulata* (probóscide: ~9cm), em B, *Manduca rustica* (probóscide: ~13cm) com pólen de *T. formosa* em sua probóscide. Em C, *Manduca paphus* (probóscide: ~10cm). Em D, *Agrius cingulata* exibindo um forte ajuste morfológico entre planta e polinizador. Em E, imagem de close-up da probóscide de uma *Agrius cingulata* com deposições de pólen de *Tocoyena formosa*.

DIFERENÇAS NAS DISTRIBUIÇÕES DO TUBO FLORAL ENTRE AS DIFERENTES ÁREAS: Com base nos resultados da ANOVA de um fator (comprimento do tubo floral~cidade, $p < 0,001$) e um teste posthoc de Tukey. A população de *T. formosa* presente na Estação Ecológica de Barreiro Rico (EBR, média= 111.89mm, sd= 10,16mm) apresentou uma distribuição nos comprimentos médios dos tubos florais maior em comparação a as populações de Pratânia (EBR-PRT $p < 0.001$, $f=8.28$) e Caldas Novas (EBR-CNV $p < 0.0001$; figura 3). Ainda, as populações de Bauru e Botucatu apresentaram diferenças com a população estudada com valores de p muito próximo ao limiar de significância, entre $0,05 > p < 0,06$ (Figura 3).

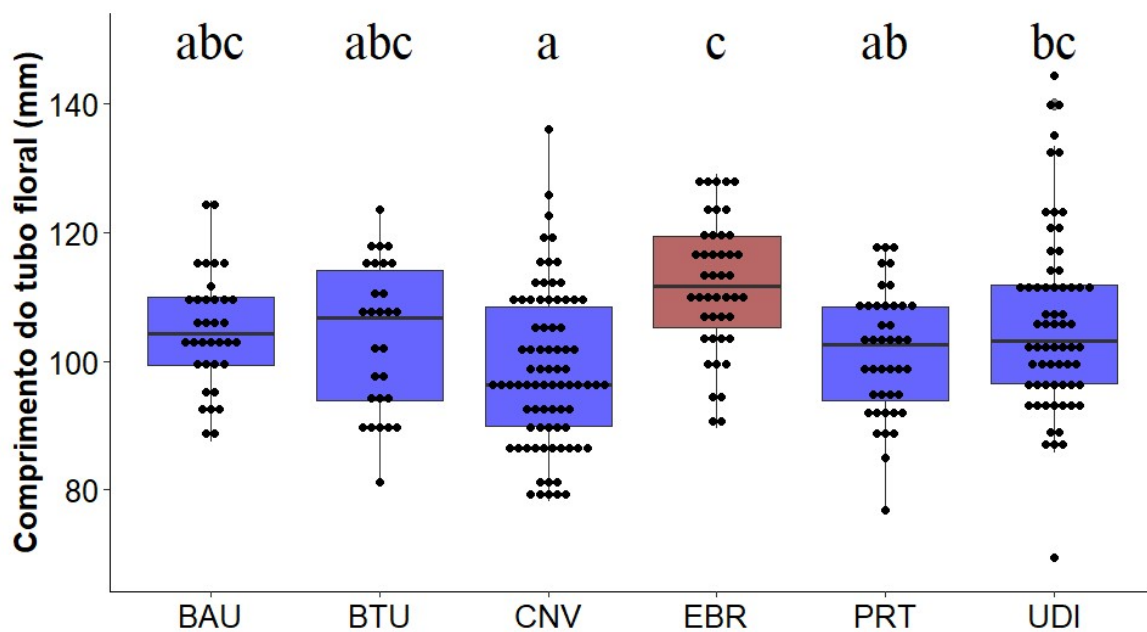


Figura 3. Gráfico das diferentes distribuições dos comprimentos do tubo floral de *Tocoyena formosa* entre diferentes áreas. Em azul, distribuições do comprimento do tubo floral de populações de *T. formosa* previamente estudadas de áreas de Cerrado *sensu strictu* pertencentes aos municípios de: Bauru (BAU), Botucatu (BTU), Caldas Novas (CNV), Pratânia (PRT) e Uberlândia (UDI). Em vermelho, a distribuição do comprimento do tubo floral da população da Estação Ecológica de Barreiro Rico (EBR). Caracteres diferentes (a,b,c) indicam diferença após teste *posthoc* de Tukey.

SELEÇÃO NATURAL MEDIADA POR POLINIZADORES: Com base no proxy: frutos iniciados totais (tabela 1, W total); identificamos a ocorrência de seleção natural direcional positiva para o atributo morfológico: Número de flores produzidas (isto é, o *display* floral) com gradientes significativos ($\beta_i = +1,879$; SE = 0,056; $P < 0,0001$; Figura 4). Em contrapartida, para os efeitos dos outros atributos florais medidos (isto é, o comprimento do tubo floral e área da corola excluindo o tubo) não observamos gradientes significativos; (Tabela 1, $\beta_i = -0,0052$; SE = 0,057, $\beta_i = -0,0167$; SE = 0,058 e figura 4). Análises adicionais indicam que os resultados não se alteram ao remover os indivíduos outliers (com muitas flores produzidas). Removendo os indivíduos outliers obtemos fundamentalmente os mesmos resultados: $\beta_i = +0,891$; SE = 0,07; $P < 0,0001$. Não foram encontrados diferenciais e ou gradientes significativos para os demais Proxys quantificados e calculados, isto é: Média de sementes produzidas por fruto, proporção de frutos iniciados pelo número de flores produzidas totais e por fim, média de sementes multiplicada pela quantidade de frutos totais dividido pelo número de flores produzidas totais.

Tabela 1. Tabela dos gradientes e diferenciais de seleção natural sob caracteres florais. Tabela dos diferenciais (Si e Ci) e gradientes (β_i e γ_i) de seleção extraídos pela abordagem mais recente de Morrissey & Sakrejda (2013) e suas significâncias expostas por “***”, considerando como Fitness o número de frutos iniciados.

ATRIBUTO (W total)	Si	Ci
Tubo Floral	-0.1082 (0.2942)	-0.2966 (0.2446)
Área da Corola	+0.3149 (0.2906)	-0.0940 (0.3033)
<i>Display</i> floral	+1.8771 (0.0541)***	+0.3231 (0.0214)***

ATRIBUTO (W total)	β_i	γ_i
Tubo Floral	-0.0052 (0.0575)	-0.0208 (0.0679)
Área da Corola	-0.0167 (0.0583)	-0.0879 (0.2445)
<i>Display</i> floral	+1.8798 (0.0565)***	-0.3009 (0.1761)

*** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

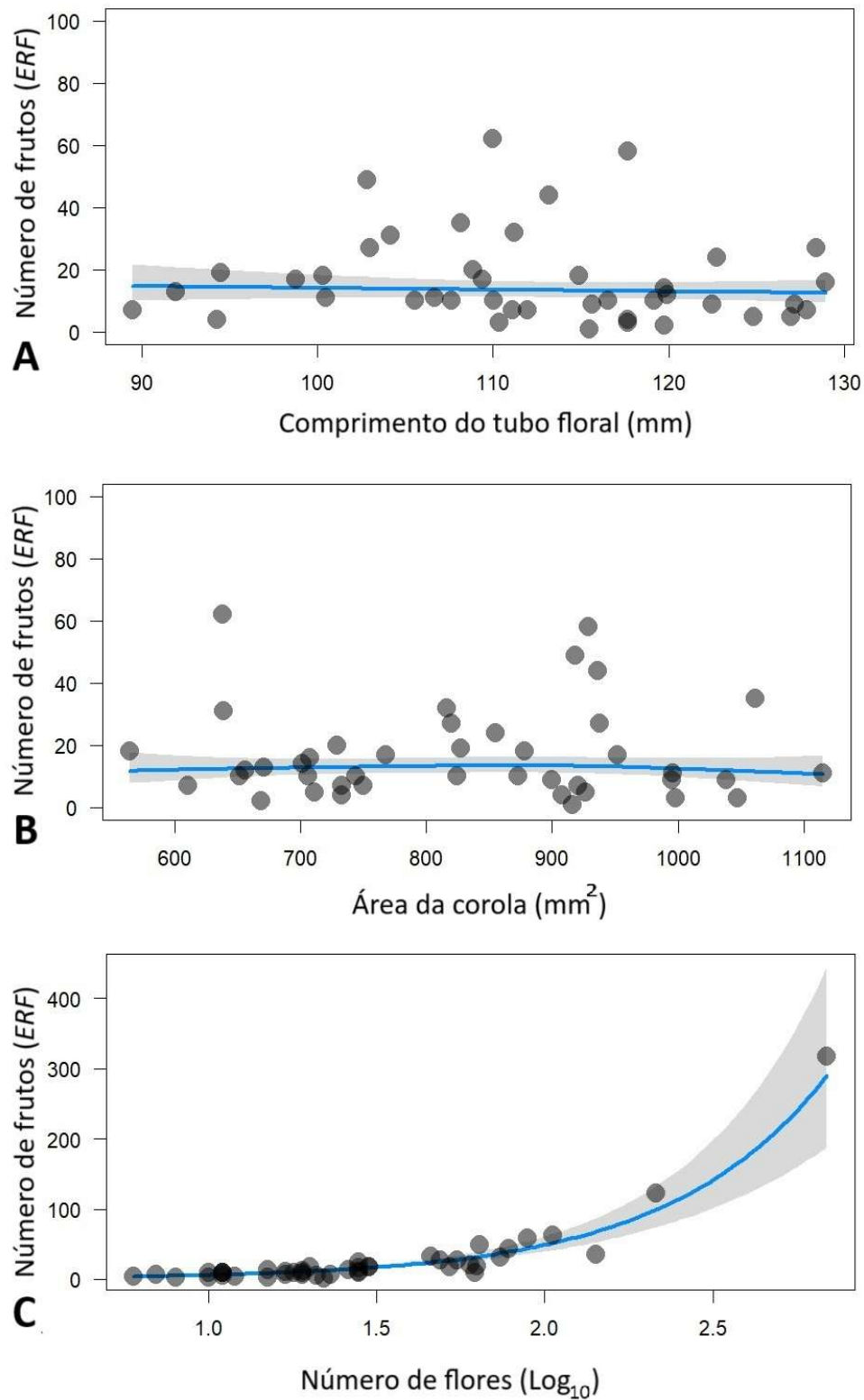


Figura 4. Relação entre atributo morfológico e êxito reprodutivo. Atributos fenotípicos analisados: comprimento do tubo, área da corola excluindo o tubo floral e número de flores produzidas / *display* floral; o *proxy* de êxito reprodutivo utilizado: frutos iniciados totais. Em A, comprimento do tubo. Em B, área da corola excluindo o tubo floral. Em C, número de flores totais produzidas.

ANÁLISES DE SELEÇÃO MEDIADA POR POLINIZADORES ENTRE POPULAÇÕES: Na população de Barreiro rico (EBR – Tabela 2 & Figura 5 em azul), identificamos a ocorrência de seleção natural direcional positiva para o atributo morfológico Número de flores produzidas, isto é, o *display* floral, com gradientes significativos (Figura 5 em B & Tabela 2, proxy0: $\beta_i = +1,879$; SE = 0,056; $P < 0,0001$). Já em relação a população de Pratânia (PRT– Tabela 2 & Figura 5 em vermelho), identificamos a ocorrência de seleção natural direcional positiva para o comprimento do tubo floral com gradientes de seleção significativos para ambos os métodos de quantificação do êxito reprodutivo feminino (Figura 5 em A & Tabela 2, proxy0: $\beta_i = +0.125$; SE = 0.056; $P < 0,05$, proxy1: $\beta_i = +0.116$; SE = 0.051; $P < 0,05$).

Em especial, na análise da medida de aptidão: proporção de frutos iniciados pelo número total de flores em relação ao número de flores (Proxy 1, Figura 5, em C e D), foram encontrados gradientes significativos, porém com comportamento direcional negativo em relação ao número de flores para Pratânia (Figura 5 em D & Tabela 2, proxy1: $\beta_i = -0.118$; SE = 0.041; $P < 0,05$) e não significativos para EBR (Figura 5 em D & Tabela 2, proxy1: $\beta_i = 0.03$; SE = 0.03; $P > 0,05$).

Tabela 2. Tabela dos gradientes e diferenciais de seleção natural sob caracteres florais por população e proxy de fitness. Tabela dos gradientes (β_i e γ_i) de seleção extraídos pela abordagem mais recente de Morrissey & Sakrejda (2013) e suas significâncias expostas por “***”, considerando como Fitness o número de frutos iniciados (proxy0) e a proporção de frutos iniciados por número de flores total por indivíduo (proxy1).

ATRIBUTO (proxy0)	β_i	γ_i
Tubo Floral (EBR)	-0.008 (0.067)	+0.0004 (0.006)
Tubo Floral (PRT)	+0.125 (0.056)*	+0.035 (0.040)
<i>Display</i> floral (EBR)	+0.936 (0.036)***	+0.876 (0.068)***
<i>Display</i> floral (PRT)	+0.556 (0.049)**	+0.309 (0.055)*

*** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

ATRIBUTO (proxy1)	β_i	γ_i
Tubo Floral (EBR)	-0.078 (0.065)	-0.0001 (0.001)
Tubo Floral (PRT)	+0.116 (0.051)*	+0.041 (0.047)
<i>Display</i> floral (EBR)	-0.033 (0.033)	-0.0001 (0.001)
<i>Display</i> floral (PRT)	-0.118 (0.041)*	+0.001 (0.001)

*** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

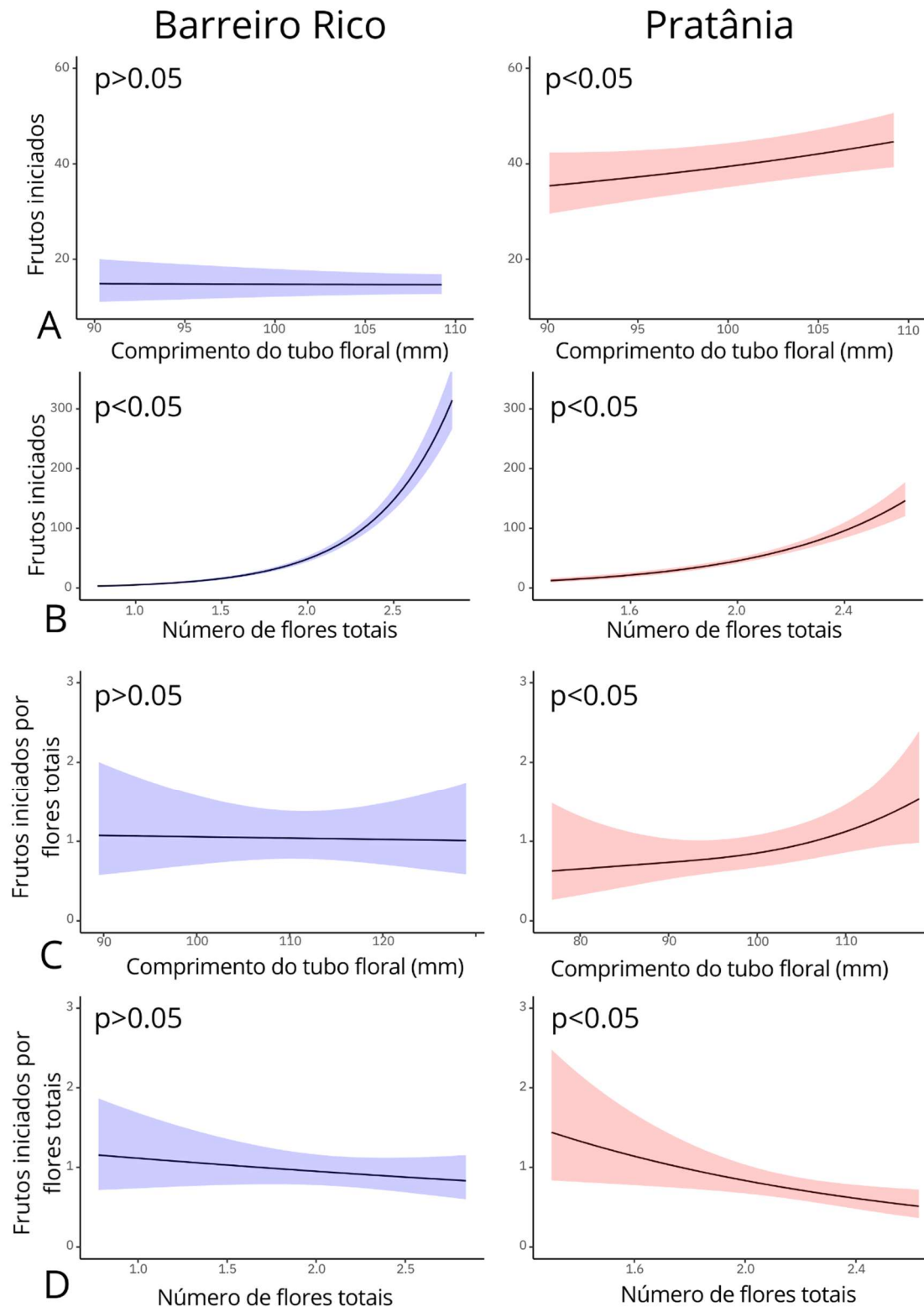


Figura 5. Relação entre atributo morfológico e êxito reprodutivo nas diferentes populações. Gráficos em azul (a esquerda) representam a população de Barreiro Rico. Gráficos em vermelho (a direita) representam a população de Pratânia. Em A, comprimento do tubo floral; Em B, número de flores totais produzidas por indivíduo. (ambos em relação ao proxy de frutos iniciados totais) Em C, comprimento do tubo floral. Em D, número de flores totais produzidas; ambos em relação ao proxy da proporção de frutos iniciados totais por flores totais por indivíduo.

ANÁLISES COMPARATIVAS ENTRE POPULAÇÕES: A análise de covariância acusou diferenças significativas (valor de $p < 0,05$) entre os modelos mais complexos (modelo: $\text{proxy} \sim \text{s}(\text{tubo}, \text{by} = \text{população}) + \text{s}(\text{flores}, \text{by} = \text{população})$), que incluem a população como um fator importante, os modelos intermediários e os modelos que não levam em conta o fator população (modelos: $\text{proxy} \sim \text{s}(\text{tubo}) + \text{s}(\text{flores})$). Então a atuação da seleção natural mediada por polinizadores difere entre a população de Barreiro Rico e Pratânia levando em conta as duas medidas de êxito reprodutivo utilizadas.

5. Discussão

Nossos resultados mostram que a população de *Tocoyena formosa* presente na Estação Ecológica de Barreiro Rico (EBR) possui uma fauna de polinizadores composta principalmente por três espécies de esfingídeos: *Agrius cingulata* (probóscide ~9 cm), *Manduca rustica* (probóscide ~13 cm) e *Manduca paphus* (probóscide ~10 cm) (veja figura 2). Embora essas espécies tenham ocorrido em todas as áreas comparadas, há registros de ocorrência concomitante de outras espécies em determinadas localidades, como *Neococytius chuentius*, cuja probóscide atinge em média ~19 cm, observada na população de Pratânia.

Todas essas espécies de esfingídeos apresentam ampla distribuição, especialmente no Cerrado, o que as torna potenciais vetores de fluxo gênico entre indivíduos e populações (Camargo et al., 2018; Johnson et al., 2017; Amorim et al., 2009; Krissa et al., 2019). Considerando suas grandes capacidades de dispersão e elevada demanda diária por recursos (chegando a consumir até um terço do peso corporal por noite), esses animais dependem de espécies vegetais que ofereçam recursos suficientes (Wasserthal, 1996). Assim, acabam se tornando importantes conectores de populações e biomas, mesmo quando estas apresentam diferenças marcantes em suas características florais (Amorim et al., 2009; Beck & Kitching, 2007; Krissa et al., 2019). Esse papel é ainda mais relevante considerando as características da região da EBR, marcada por alta diversidade beta, além da presença de flores esfingófilas em todos os biomas brasileiros, frequentemente ocupando grandes extensões (Camargo et al., 2018; Johnson et al., 2017).

A população da EBR apresentou distribuições do comprimento do tubo floral significativamente maiores em comparação com as populações de Pratânia (a 50 km de EBR) e Caldas Novas (a 600 km de EBR) (figura 3). Esse padrão reforça hipóteses sobre variações morfológicas em espécies amplamente distribuídas e sobre adaptações locais

mediadas pela fauna polinizadora, mesmo quando algumas populações estão dentro da capacidade de dispersão de polinizadores amplamente distribuídos, como *Manduca rustica* e *Neococytius cluentius* (Pauw et al., 2009; Thompson, 2005; Amorim et al., 2009). Além disso, mesmo que outras populações não apresentem diferenças estatisticamente significativas em relação à EBR, observam-se tendências e diferenças relevantes entre as regiões (figura 3, gráficos em azul). Por exemplo, 75% da distribuição do comprimento do tubo floral da EBR está acima de pelo menos 50% a 75% de todas as outras populações, havendo ainda diferenças significativas entre as populações de Caldas Novas (CNV) e Uberlândia (UDI), o que fornece mais suporte a essas hipóteses (Soteras et al., 2020; Pauw et al., 2009; Anderson & Johnson, 2008; Thompson, 2005).

Somando essas distribuições do comprimento do tubo floral (entre aproximadamente 90 mm e 130 mm), os registros dos comprimentos das probóscides dos polinizadores (também entre 90 mm e 130 mm, em média) e os registros imagéticos das interações (veja figura 2, em D), é possível inferir uma possibilidade de existir um forte ajuste morfológico entre planta e polinizador na população da EBR (Solís & Vallejo, 2017; Sazatornil et al., 2016). Um ajuste morfológico elevado entre planta e polinizador promove diretamente um aumento no fitness dos indivíduos (Wenzell, 2024; Moré et al., 2012), pois otimiza o contato do polinizador com os órgãos reprodutivos da flor, aumentando a remoção e deposição de pólen e, conseqüentemente, o sucesso reprodutivo da espécie (Solís-Montero & Vallejo-Marín, 2017; Moré et al., 2012; Sazatornil et al., 2016).

Esse cenário de forte ajuste morfológico também foi observado na população de Uberlândia (UDI), cuja distribuição do comprimento do tubo floral variou entre 85,69 mm e 135,07 mm, com comprimentos de probóscides equivalentes. Em contrapartida, a população de Pratânia (PRT), situada a menos de 50 km da EBR e dentro da capacidade de dispersão dos esfingídeos (Camargo et al., 2018; Krissa et al., 2019; Wasserthal, 1996), revelou um cenário oposto. Em PRT, o comprimento do tubo floral variou de 76,82 mm a 118,31 mm, enquanto o comprimento das probóscides variou de 90 mm a 190 mm (com presença de *Neococytius cluentius*), evidenciando um desajuste morfológico marcante em comparação com as duas populações anteriores.

Esses diferentes contextos morfológicos entre populações refletem diretamente a atuação da seleção natural mediada por polinizadores. Na EBR, onde há um forte ajuste morfológico entre planta e polinizador, foram observados gradientes de seleção direcional positivos e significativos para maior número de flores por indivíduo, ou seja, para o

display floral, em relação ao número total de frutos iniciados (representando o resultado bruto da polinização, dado que *T. formosa* é autoincompatível). O display floral está diretamente associado à maior atração de polinizadores e ao sucesso reprodutivo das espécies, modulando as dinâmicas de exportação e recepção de pólen ao longo da floração (Beck et al., 2007; Grindeland et al., 2005; Benitez-Vieyra et al., 2006). Esse atributo é ainda mais relevante para animais noturnos, como os esfingídeos, que dependem fortemente de compostos voláteis e da luz refletida pelas cores claras típicas dessas flores (Johnson et al., 2017; Nilsson, 1988). Além disso, somando-se à protandria característica de *T. formosa* e ao cenário de forte ajuste morfológico na EBR, o aumento no display floral eleva as chances de recepção cruzada de pólen durante a fase feminina da flor, aumentando o fitness dos indivíduos (Benitez-Vieyra et al., 2005; Grindeland et al., 2005; Mitchell et al., 2004).

Esse mesmo padrão foi observado na população de UDI, onde também foram encontrados fortes ajustes morfológicos e gradientes significativos de seleção para o display floral. Já em PRT, o fraco ajuste morfológico resultou em gradientes significativos de seleção direcional positiva para o comprimento do tubo floral. Isso reforça o conhecimento de que, em sistemas especializados com esfingídeos, o comprimento do tubo floral é um dos atributos florais mais importantes (Solís & Vallejo, 2017; Sanz-Veiga et al., 2021). O tubo floral atua no ajuste entre planta e polinizador, permitindo o acesso ao néctar apenas a indivíduos com probóscides suficientemente longas. Assim, esse atributo tende a ser favorecido pela seleção, aumentando a eficiência da interação (Tong et al., 2024; Moré et al., 2012).

Outro ponto de divergência entre as populações está relacionado ao Proxyl (proporção de frutos iniciados por flor formada), um indicativo da efetividade da polinização levando em conta o número de flores. Em sistemas especializados, esse indicador pode refletir a escassez de polinizadores e/ou de visitas eficazes (Wenzell et al., 2024; Wasserthal, 1996). Nesse sentido, a observação de gradientes negativos significativos apenas para PRT apoia a hipótese de escassez de polinizadores eficientes nessa população, em contraste com EBR, onde não se observaram gradientes significativos para esse proxy. Isso sugere que, além da possível escassez de polinizadores em PRT, o desajuste morfológico já descrito também compromete a eficiência das interações planta-polinizador (Moré et al., 2012).

Considerando que as populações da EBR e PRT foram bem amostradas e apresentaram boa representatividade, foi possível avaliar formalmente as diferenças na atuação da seleção natural mediada por polinizadores. A partir da modelagem por GAM em um conjunto de dados unificado e comparações entre modelos com diferentes complexidades (via análises de covariância), identificamos diferenças significativas entre essas populações usando ambos os proxys. Contudo, para a EBR, o proxy relacionado ao número de frutos por flor produzida não foi significativo nas análises de seleção. Assim, fatores como diferenças nos comprimentos dos tubos florais, na composição da fauna de esfingídeos, na reciprocidade morfológica e nas condições abióticas locais geram efeitos relevantes em microescala. Como consequência, diferentes atributos florais estão sendo selecionados em resposta a esse mosaico de condições ecológicas nas diversas populações de *T. formosa* (Soteras et al., 2020; Moré et al., 2012; Pauw et al., 2009; Thompson, 2005).

6. Conclusões

Podemos concluir que nossos resultados apoiam as teorias de mosaico geográfico coevolutivo de John Thompson e as propostas variações geográficas e temporais na reciprocidade morfológica planta-polinizador que resultam em seleção fenotípica mediada pela fauna local. E, embora a população de Barreiro Rico não esteja sendo selecionada para o atributo mais importante deste sistema de polinização, ou seja, o comprimento do tubo floral. A comparação com outras populações da mesma espécie em cenários de interação diferentes pode oferecer evidências para as hipóteses de ajuste morfológico e suas implicações para a seleção fenotípica mediada por polinizadores e para a dinâmica das interações planta e polinizador inicialmente proposta por Darwin e que vem sendo discutidas até hoje.

Também, podemos concluir que a população de *Tocoyena formosa* presente na Estação Ecológica de Barreiro rico, possui uma fauna de polinizadores consistente e comum entre as populações embora a distribuição do comprimento do tubo floral de suas flores ser significativamente maior que outras populações e apresentar uma tendencia geral a ser mais longos. Também, a população de EBR está sendo selecionada em resposta aos polinizadores para maiores *displays* florais; um atributo morfológico ligado a atração

e modulação nas interações e que tem como efeito direto, alterações no sucesso reprodutivo das espécies.

Ademais, as populações de Barreiro Rico e Pratânia possuem diferenças importantes nos fatores bióticos, como a composição da fauna de polinizadores e a conformação populacional dos atributos florais, e abióticos, como a disposição geográfica do cerrado em relação a outros biomas como a mata atlântica, que resultam em diferenças significativas e formais na atuação da seleção natural mediada por polinizadores.

7. Referências

- Amorim, F.W., Avila Jr., R.S., Camargo, A., Oliveira, P.E. 2009. A hawkmoth crossroads? Species richness, seasonality and biogeographical affinities in a Sphingidae in a Brazilian Cerrado. *Journal of Biogeography*, **36**: 662-674.
- Amorim, F.W., Marino, S., Sanz-Veiga, P.A., Ollerton, J., Oliveira, P.E.. 2022. Short flowers for long tongues: functional specialization in a nocturnal pollination network of an asclepiad in long-tongued hawkmoths. *Biotropica*, **54**:729-738
- Anderson, B., Johnson, S.D. 2008. The geographical mosaic of coevolution in a plant-pollinator mutualism. *Evolution*, **62**:220-225.
- Agren J, Hellström F, Toräng P, Ehrlén J. Mutualists and antagonists drive among-population variation in selection and evolution of floral display in a perennial herb. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013 Nov 5; 110(45):18202-7 doi: 10.1073/pnas.1301421110. Epub 2013 Oct 21. PMID: 24145439; PMCID: PMC3831491.
- Beck, J., Kitching, I.J. 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.
- Benitez-Vieyra, S., Medina, A.M., Glinos, E. and Cocucci, A.A. (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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2006.01179.x>
- Bartkowska, M.P. and Johnston, M.O. (2012), Pollinators cause stronger selection than herbivores on floral traits in *Lobelia cardinalis* (Lobeliaceae). *New Phytologist*, **193**: 1039-1048. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.04013.x>
- Camargo, A.J.A., Camargo, W.R.F., Corrêa, D.C.V., Vilela, M.F., Amorim, F.W. 2018. Mariposas Polinizadoras do Cerrado: Identificação, distribuição, importância e Conservação. Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, Brazil. <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/187279/1/Livro-web.pdf>.
- Cavalheiro, Lis & Vizentin-Bugoni, Jeferson & Spaniol, Ricardo & Iserhard, Cristiano. (2024). Hawkmoths' evolutionary history structures plant-pollinator interactions frequency, beyond its effect through ecological traits. 10.22541/au.167285904.43333980/v3.
- Farminhão, João & Savignac, Marie & Droissart, Vincent & Lowry II, Porter & Rajaonarivelo, Nirina & Ramandimbisoa, Brigitte & Verlynde, Simon & Todivelo, Arsela & Stévant, Tariq. (2024). A new orchid species expands Darwin's predicted pollination guild in Madagascar. *Current Biology*. **34**. 175-194. 10.1016/j.cub.2024.01.012.

- Grindeland, J. M., N. Sletvold, and R. A. Ims. 2005. "Effects of Floral Display Size and Plant Density on Pollinator Visitation Rate in a Natural Population of *Digitalis Purpurea*." *Functional Ecology*, **19**, no. 3: 383–90.
- Johnson, S.D. 2010. The pollination niche and its role in the diversification and maintenance of southern African flora. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, **365**:499-516.
- Johnson, S.D., Moré, M., Amorim, F.W., Haber, W., Frankie, G.; Satanley, D., Cocucci, A., Raguso, R. 2017. The long and the short of it: a global analysis of hawkmoth pollination niches and interaction networks. *Functional Ecology*, **31**: 101-115.
- Johnson, S.D., Balducci, M.G., Bijl, A., Castañeda-Zárate, M., Cozien, R.J., Ortmann, C.R., van der Niet, T. 2020. From dusk till dawn: camera traps reveal the diel patterns of flower feeding by hawkmoths. *Ecological Entomology*, **45**: 751-755.
- Kindlmann, P., Jersáková, J. 2006. Effect of floral display on reproductive success in terrestrial orchids. *Folia Geobot* 41, 47–60.
- Krissa A. Skogen, Rick P. Overson, Evan T. Hilpman, and Jeremie B. Fant "Hawkmoth Pollination Facilitates Long-Distance Pollen Dispersal and Reduces Isolation Across a Gradient of Land-Use Change," *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **104**(3): 495-511, 019.
- Lande, R., Arnold, S.J. 1983. The measurement of selection on correlated characters. *Evolution*, **37**:1210-1226.
- Mitchell, R. J., Karron, J. D., Holmquist, K. G., & Bell, J. M. (2004). The Influence of *Mimulus ringens* Floral Display Size on Pollinator Visitation Patterns. *Functional Ecology*, **18**(1), 116–124.
- Mitchell, R. J., Karron, J. D., Holmquist, K. G., & Bell, J. M. (2004). The Influence of *Mimulus ringens* Floral Display Size on Pollinator Visitation Patterns. *Functional Ecology*, **18**(1), 116–124.
- Myers, N., Mittermeier, R., Mittermeier, C. *et al.* Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* **403**, 853–858 (2000). <https://doi.org/10.1038/35002501>
- Moré M, Amorim FW, Benitez-Vieyra S, Medina AM, Sazima M, Cocucci AA. 2012. Armament imbalances: match and mismatch in plant-pollinator traits of highly specialized long-spurred orchids. *PLoS One*. **7**(7):e41878.
- Morrissey, M.B., Sakrejda, K. 2013. Unification of regression-based methods for the analysis of natural selection. *Evolution*, **67**: 2094-2100.
- Nilsson, L. The evolution of flowers with deep corolla tubes. *Nature* 334, 147–149 (1988). <https://doi.org/10.1038/334147a0>
- Oliveira, P.E., Gibbs, P.E., Barbosa, A.A. 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.
- Oliveira R, Duarte Jr. JA, Rech AR, De Avila Jr. RS. 2014. Polinização por Lepidopteros. In: Rech AR, Agostini K, Oliveira PE, Machado IC (eds.), *Biologia da Polinização. Editora Projeto Cultural*, Rio de Janeiro, Brasil. P.p. 235-258
- Opedal, Øystein (2021) "A functional view reveals substantial predictability of pollinator-mediated selection", *Journal of Pollination Ecology*, 30, pp. 273–288. doi: 10.26786/1920-7603(2021)673.
- Pauw, A., Stofberg, J., Waterman, R.J. 2009. Flies and flowers in Darwin's race. *Evolution*, **63**:268-79.
- Ratter, J.A., Bridgewater, S. & Ribeiro, J.F. 2003. Analysis of the floristic composition of the Brazilian Cerrado vegetation III: comparison of the woody vegetation of 376 areas. *Edinburgh Journal of Botany*, **60**:57-109.

- Sanz-Veiga, P.A., Polizello, D.S., Silva, D.P., Savaris, M., Amorim, F.W. 2021. The specialist of a specialist: the natural history of the predispersal seed predator weevil *Hemicolpus abdominalis* (Coleoptera: Curculionidae). *Ecological Entomology*, **46**: 1006-1018.
- Sazatornil, F. D., Moré, M., Benitez-Vieyra, S., Cocucci, A.A., Kitching, I.J., Schlumpberger, B.O., Oliveira, P.E., Sazima, M. and Amorim, F.W. 2016. Beyond neutral and forbidden links: morphological matches and the assembly of mutualistic hawkmoth–plant networks. *J Anim Ecol*, **85**: 1586-1594.
- Silberbauer-Gottsberger, I., Gottsberger, G. 1975. Über sphingophile Angiospermen brasiliens. *Plant Systematic and Evolution*, **123**:157-184.
- Silberbauer-Gottsberger, I. 1972. Anthese und Bestubung der Rubiaceen *Tocoyena brasiliensis* und *T. formosa* aus dem Cerrado Brasiliens. *Sterreichische Botanische Zeitschrift*, **120**:1-13.
- Simón-Porcar, V., Escudero, M., Santos-Gally, R. et al. Convergent evolutionary patterns of heterostyly across angiosperms support the pollination-precision hypothesis. *Nat Commun* 15, 1237 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41467-024-45118-0>.
- Sletvold N, Agren J. Nonadditive effects of floral display and spur length on reproductive success in a deceptive orchid. *Ecology*. 2011 Dec;92(12):2167-74. doi: 10.1890/11-0791.1. PMID: 22352154.
- Sletvold, N., Tye, M. and Ågren, J. (2017), Resource- and pollinator-mediated selection on floral traits. *Funct Ecol*, 31: 135-141. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12757>
- Solís-Montero L, Vallejo-Marín M. 2017. Does the morphological fit between flowers and pollinators affect pollen deposition? An experimental test in a buzz-pollinated species with anther dimorphism. *Ecol Evol*, **7**: 2706–2715.
- Soteras F, Rubini Pisano MA, Bariles JB, Moré M, Cocucci AA. Phenotypic selection mosaic for flower length influenced by geographically varying hawkmoth pollinator proboscis length and abiotic environment. *New Phytol*. 2020 Jan;225(2):985-998. doi: 10.1111/nph.16192. Epub 2019 Oct 30. PMID: 31514238.
- Stebbins, G.L. 1970. Adaptive radiation of reproductive characteristics in angiosperms. I. Pollination mechanisms. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **1**:307-326.
- Temeles, E.J., Kress, W.J. 2003. Adaptation in a plant-hummingbird association. *Science*, **300**:630-633.
- Thompson, J.N. 2005. *The geographic mosaic of coevolution*. Chicago, IL, USA: University of Chicago Press
- Tong, ZL., Cha, YP., Ma, YM. et al. Pollinator-mediated selection on flowering start and corolla tube length differed between mating systems in a primrose species. *Evol Ecol* 38, 927–939 (2024). <https://doi.org/10.1007/s10682-024-10318-z>.
- Vellend M. Conceptual synthesis in community ecology. *Q Rev Biol*. 2010 Jun;85(2):183-206. doi: 10.1086/652373. PMID: 20565040.
- Wenzell, K. E., Zhang, J. Y., Skogen, K. A., & Fant, J. B. (2024). Adaptive generalization in pollination systems: Hawkmoths increase fitness to long-tubed flowers, but secondary pollinators remain important. *Ecology and Evolution*, 14, e11443. <https://doi.org/10.1002/ece3.11443>.