



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU  
DEPARTAMENTO DE BIOESTATÍSTICA, BIOLOGIA VEGETAL, PARASITOLOGIA E ZOOLOGIA

**PABLO HENRIQUE DE OLIVEIRA**

**ANTAGONISTAS *VERSUS* MUTUALISTAS: COMO AS INTERAÇÕES  
ENTRE UMA ESPÉCIE ESPECIALIZADA COM SEUS FLORÍVOROS E  
POLINIZADORES SÃO MEDIADAS POR VOLÁTEIS FLORAIS**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU  
DEPARTAMENTO DE BIOESTATÍSTICA, BIOLOGIA VEGETAL, PARASITOLOGIA E ZOOLOGIA

**ANTAGONISTAS *VERSUS* MUTUALISTAS: COMO AS INTERAÇÕES  
ENTRE UMA ESPÉCIE ESPECIALIZADA COM SEUS FLORÍVOROS E  
POLINIZADORES SÃO MEDIADAS POR VOLÁTEIS FLORAIS**

PABLO HENRIQUE DE OLIVEIRA

Felipe Wanderley de Amorim  
Orientador

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) do Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre.

BOTUCATU – SP  
2021

O48a Oliveira, Pablo Henrique de  
Antagonistas versus mutualistas: como as interações entre uma espécie especializada com seus florívoros e polinizadores são mediadas por voláteis florais / Pablo Henrique de Oliveira. -- Botucatu, 2021  
45 p. : tabs., fotos  
  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Botucatu  
Orientador: Felipe Wanderley de Amorim  
  
1. Ecologia. 2. Polinização. 3. Escarabeídeo. 4. Lepidóptero. 5. Botânica. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer aos meus pais, Luciano e Marcia, pela vida e por sempre terem feito o possível e o impossível para me dar o bem mais precioso que existe: o conhecimento. Ao meu irmão, Patrick, aos meus tios, meus avós, meus amigos que a vida, a faculdade, e a música me deram, à minha ex-companheira Tatiana Roveran, por todo amor e apoio em todos esses anos, e a todos os bichinhos de estimação que estiveram e ainda estão presentes na minha vida. Sem vocês eu já teria enlouquecido nesse mundo. Obrigado por tudo, amo vocês!

Encarecidamente, agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pela bolsa de mestrado concedida a mim e que me permitiu fazer um trabalho de maior qualidade, e a todos os colegas cientistas que colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho. Ao meu orientador Felipe Wanderley Amorim, do Instituto de Biociências de Botucatu – IBB/UNESP, pela concepção do trabalho e suporte dado a todo momento; Aos membros da minha banca de qualificação e de defesa, Carlos Eduardo Pereira Nunes e Artur Campos Dália Maia, por todas as valiosas contribuições que foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho; Ao José Maurício Simões Bento e Arodí Prado Favaris, da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ/USP, que nos ajudaram na coleta e identificação dos voláteis florais e na realização dos experimentos em campo realizados em Cassilândia – MS; ao Diogo Montes Vidal, da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, que fez toda a síntese do composto volátil sintético; e ao Paschoal Coelho Grossi, da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, que fez a identificação dos besouros coletados em campo.

**SUMÁRIO**

|                                                                            |           |
|----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>                                                  | <b>8</b>  |
| <b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                                          | <b>14</b> |
| <b>2.1. ÁREA DE ESTUDO.....</b>                                            | <b>14</b> |
| <b>2.2. BIOLOGIA FLORAL E SISTEMA REPRODUTIVO.....</b>                     | <b>14</b> |
| <b>2.3. VISITANTES FLORAIS E EXPERIMENTO DE EXCLUSÃO.....</b>              | <b>15</b> |
| <b>2.4. COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS (COVs).....</b>                       | <b>17</b> |
| <b>2.5. BIOENSAIOS DE CAMPO DA ATRATIVIDADE DOS BESOUROS AOS COVS.....</b> | <b>19</b> |
| <b>2.6. ANÁLISE DE DADOS.....</b>                                          | <b>20</b> |
| <b>3. RESULTADOS.....</b>                                                  | <b>20</b> |
| <b>3.1. BIOLOGIA FLORAL E SISTEMA REPRODUTIVO.....</b>                     | <b>21</b> |
| <b>3.2. VISITANTES FLORAIS E EXPERIMENTO DE EXCLUSÃO.....</b>              | <b>22</b> |
| <b>3.3. COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS E BIOENSAIOS DE CAMPO.....</b>        | <b>26</b> |
| <b>4. DISCUSSÃO.....</b>                                                   | <b>27</b> |
| <b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                                  | <b>32</b> |

## RESUMO

Esfigofilia é a denominação das plantas adaptadas à polinização por mariposas da família Sphingidae, cuja atração se dá em grande parte por meio de compostos orgânicos voláteis (COVs). *Mandevilla longiflora* é uma espécie cuja morfologia floral sugere polinização exclusiva por espécies de esfingídeos com probóscide longa, embora esfingídeos nunca tenham sido observados nas populações de *M. longiflora* do Brasil, e a espécie seja frequentemente visitada por besouros Cyclocephalini (Melolonthidae), cuja atração em outras espécies se dá através de COVs florais. Dada a grande frequência de uma espécie do gênero *Cyclocephala* nas flores de *M. longiflora*, esse trabalho teve como objetivos analisar o papel de COVs na atração dos potenciais polinizadores primários de *M. longiflora*, i.e., mariposas da família Sphingidae, bem como do seu principal visitante floral, i.e., besouros Cyclocephalini. Nós testamos se estes besouros poderiam atuar como polinizadores de *M. longiflora*. Além disso, realizamos observações dos visitantes florais e experimentos de exclusão de visitantes para analisar a contribuição dos besouros para reprodução da espécie. Também estudamos a biologia floral, e por meio de experimentos de polinização controlada, analisamos seu sistema reprodutivo e a dependência de polinizadores para a reprodução. Finalmente, coletamos e analisamos os COVs produzidos pelas flores de *M. longiflora* e testamos a atratividade desses COVs aos besouros. *M. longiflora* é uma espécie autocompatível, porém estritamente dependente de polinizadores para a sua reprodução. Foram registradas apenas cinco visitas de esfingídeos de uma única espécie, *Agrius cingulata*, o que sugere que estas mariposas são visitantes pouco frequentes, mas atuam como polinizadores bastante efetivos da espécie. O principal COV produzido pela flor foi o 3-metil-butiraldoxima, o qual foi altamente atrativo a *Cyclocephala paraguayensis*, o principal visitante floral e florívoro de *M. longiflora*. Os experimentos de exclusão mostraram que o besouro não atua como polinizador de *M. longiflora*, agindo apenas como herbívoro floral, consumindo principalmente as anteras e o pólen da flor. Apesar da existência de diversas espécies atraentes aos besouros Cyclocephalini na área de estudo, *C. paraguayensis* foi registrado apenas em *M. longiflora*, tendo o comportamento de um florívoro de uma flor esfingófila e sendo altamente atraído pelos voláteis florais da espécie. A dependência estrita de polinizadores para a sua reprodução, associada à baixa frequência de esfingídeos levou a uma elevada limitação de pólen na população estudada. Considerando o comportamento desses visitantes florais, este trabalho mostra que as interações planta-esfingídeo e planta-besouro são mediadas pelos mesmos voláteis florais resultando em um importante *trade-off* entre a atração dos polinizadores e dos principais florívoros. Embora essa interação possa ser prejudicial para o fitness da planta, a ocorrência de autocompatibilidade permite que as visitas de esfingídeos, ainda que pouco frequentes, sejam extremamente eficientes.

## INTRODUÇÃO

A grande diversidade de atributos florais observada nas angiospermas, tais como a cor, forma da flor, o horário de antese, as características anatômicas, assim como a composição química do néctar e dos voláteis florais, são em grande parte resultantes de pressões seletivas mediadas pelos polinizadores (Gómez & Zamora 2006; Harder & Johnson 2009; Moré et al. 2012). As adaptações das flores aos seus polinizadores são determinantes na configuração dos atributos florais e nos fornecem uma base empírica para entendermos os mecanismos de seleção natural (Nilsson 1988; Micheneau et al. 2009). Um clássico exemplo das interações planta-polinizador em um contexto coevolutivo é o dado por Charles Darwin em seu livro sobre polinização de orquídeas (Darwin 1862), no qual ele sugere um potencial polinizador da orquídea malgaxe, *Angraecum sesquipedale*, embasado na morfologia floral. Segundo Darwin, *A. sesquipedale* deveria estar relacionada com uma mariposa da família Sphingidae, cujo aparato bucal seria tão longo quanto o esporão nectarífero da orquídea. A predição de Darwin foi reforçada pela descoberta de Fritz Müller no Brasil, de uma mariposa cujo comprimento da probóscide era superior a 25 cm (Müller 1873), e 41 anos depois confirmada através da descrição de *Xantophan morganii* subs. *praedicta* em florestas de Madagascar (Rothschild & Jordan 1903).

As síndromes de polinização nos permitem inferir o principal polinizador de uma espécie vegetal baseado em suas características florais. Entretanto, o poder de predição das síndromes de polinização é variável, pois nem sempre o polinizador mais efetivo pode ser efetivamente predito pelas características florais (Hingston & Mcquillan 2000; Ollerton et al. 2009; Danieli-Silva et al. 2012). Por outro lado, plantas tipicamente esfingófilas são funcionalmente especializadas em espécies de esfingídeos com probóscide longa, e a morfologia floral torna a polinização por outros grupos de visitantes florais pouco provável. Tubos florais extremamente longos, por sua vez, constituem um caractere morfológico

derivado, cuja reversão para outros sistemas de polinização é pouco provável, já que dificilmente outros agentes são capazes de exercer pressões seletivas que possibilite uma mudança evolutiva que leve à redução do comprimento do tubo floral (veja Whittall & Hodges 2007; Tripp & Manos 2008).

As interações planta-polinizador dependem do reconhecimento dos atributos florais pelos polinizadores, pois para que a polinização aconteça é necessário que haja a atração destes vetores bióticos e contato com as anteras e estigma da flor. Essa atração ocorre por meio de sinais florais que indicam algum tipo de recurso que pode ser utilizado pelos visitantes florais (Chittka & Raine 2006; Farré-Armengol et al. 2013). Particularmente, os perfumes florais desempenham um papel importante na mediação das interações planta-polinizador (Raguso et al. 2015), embora os mesmos perfumes também possam ser utilizados por antagonistas, como os florívoros, por exemplo. Animais florívoros também podem utilizar os mesmos canais de comunicação da planta com os seus polinizadores, como atrativo para encontrar as flores nas quais irão se alimentar e se reproduzir (Baldwin et al. 1997; Theis 2006; Andrews et al. 2007; Nunes et al. 2016). Assim, compostos orgânicos voláteis, associados às pistas táteis e visuais, são importantes para atração e reconhecimento das flores pelos visitantes florais, sejam eles mutualistas ou antagonistas (Williams & Whitten 1983; Wright & Schiestl 2009).

Flores polinizadas por mariposas da família Sphingidae, *i.e.*, esfingídeos, compartilham características associadas à atração destes animais, tais como antese noturna, coloração pálida, néctar rico em sacarose e odor floral adocicado. São usualmente grandes, tubulares, hipocrateriformes ou com longos calcares ou esporões, muitas vezes solitárias, pendentes ou dispostas horizontalmente (Vogel 1954; Baker 1961; Silberbauer-Gottsberger & Gottsberg 1975; Faegri & van der Pijl 1979; Haber & Frankie 1989; Silva & Sazima 1995; Martins & Johnson 2013; Amorim et al. 2014; Johnson et al. 2017). Tais espécies



normalmente possuem plataforma de pouso reduzida, já que os esfingídeos são capazes de adejar em frente às flores para acessar ao néctar (Oliveira et al. 2004). As flores das espécies adaptadas à polinização por esfingídeo, geralmente produzem perfumes com predominância de terpenos, benzenoides, compostos nitrogenados, jasmonatos, lactonas e tiglatos, que, em conjunto, compõem a denominada “imagem floral branca” (Nilsson 1983; Knudsen & Tollsten 1993; Kaiser 1993; Raguso & Pichersky 1995).

*Mandevilla longiflora* (Desf.) Pichon (Apocynaceae) é uma espécie cuja morfologia floral sugere uma especialização estrita à polinização por esfingídeos, apresentando antese noturna, corola branca e com tubo floral estreito, cujo comprimento pode ser superior a 10 cm, e produz um perfume floral adocicado exclusivamente durante a noite (Silberbauer-Gottsberger & Gottsberger 1975; Moré et al. 2007). A espécie ocorre na América do Sul no Uruguai, Argentina, Paraguai, Bolívia e Brasil (Barban 1985). No Brasil distribui-se exclusivamente em áreas de campo limpo, campo rupestre e cerrado *stricto sensu* (Koch et al. 2015). O mecanismo de polinização de *M. longiflora* foi descrito em um estudo realizado com uma população da Argentina, no qual registros indiretos (por meio da análise da carga polínica aderida à probóscide de esfingídeos capturados em armadilha luminosa) sugerem que a espécie é efetivamente polinizada por *Manduca sexta*, uma espécie de esfingídeo cujo comprimento da probóscide é superior a 8,0 cm (Moré et al. 2007). Entretanto, embora a espécie seja relativamente comum no Brasil, não há registros de esfingídeos visitando a espécie nem mesmo através de observações indiretas. Isso ocorre a despeito de várias espécies de esfingídeos com probóscide compatível ao comprimento do tubo floral de *M. longiflora* ocorrerem ao longo da área de distribuição da planta no Cerrado (veja Camargo et al. 2018). Por outro lado, no Brasil, *M. longiflora* é frequentemente visitada por besouros da tribo Cyclocephalini (Melolonthidae, Dynastinae) (Gottsberger 1986; Gottsberger & Silberbauer-Gottsberger 2006; F.W. Amorim observações pessoais).

Besouros Cyclocephalini (Melolonthidae, Dynastinae) são importantes polinizadores de várias espécies pertencentes a diferentes famílias de angiospermas, como Annonaceae (Gottsberger 1986, Gottsberger & Silberbauer-Gottsberger 2006; Maia et al. 2012), Araceae (Young 1986, Gottsberger & Silberbauer-Gottsberger 2006; Maia et al. 2012; Paulino-Neto 2014), Magnoliaceae (Thien 1974; Dieringer & Espinosa 1994; Dieringer et al. 1999; Seymour et al. 2010; Gottsberger et al. 2012) e Nymphaeaceae (Prance 1980). A polinização por besouros dinastíneos em algumas espécies de Annonaceae, Araceae e Magnoliaceae está intimamente associada à produção de uma série de compostos orgânicos voláteis (COVs) (Dötterl et al. 2012; Gottsberger et al. 2012, 2013; Maia et al. 2012, 2013), o que demonstra a importância desses atributos florais na mediação de sistemas de polinização envolvendo besouros Cyclocephalini.

Embora os voláteis florais sejam importantes na atração de besouros polinizadores, esse canal químico também pode ser utilizado por besouros Cyclocephalini para encontrar flores nas quais possam se alimentar de pólen e tecidos florais, especialmente em Arecaceae (Maia et al. 2018, 2020). Algumas dessas espécies que atuam como florívoros são *Cyclocephala amazona*, *C. distincta* e *C. forsteri*, as quais podem afetar diretamente a floração e frutificação de espécies como *Attalea butyracea* e *Acrocomia* spp., sendo considerados como potenciais pragas dessas culturas (Oliveira & Ávila 2011; Maia et al. 2018, 2020). Assim, a emissão de voláteis florais permite com que os besouros ocupem diversos nichos ecológicos, podendo atuar como visitantes florais (Gottsberger 1986; Hegland & Boeke 2006), polinizadores (Gottsberger 1988; Silberbauer-Gottsberger 1990; Gottsberger et al. 2012) e herbívoros (Theis 2006; Theis & Adler 2012), inclusive de espécies vegetais não associadas primariamente à síndrome da cantarofilia.

Além de compostos orgânicos voláteis, uma série de outros atributos florais está relacionada à especialização para a polinização por besouros. Flores cantarófilas são

137 caracterizadas por terem poucos atrativos visuais, nenhuma forma característica ou definida,  
138 além de não possuírem guia de néctar. São geralmente grandes, planas, cilíndricas ou rasas,  
139 ou mesmo em forma de tigela. As cores são de tons frequentemente esverdeado ou  
140 esbranquiçado, com pétalas carnosas, maciças e nutritivas. Além disso, são  
141 predominantemente hermafroditas, protogínicas e autocompatíveis, com algumas  
142 apresentando câmaras florais (Faegri & Van der Pijl 1979; Barford et al. 1987). Flores em  
143 formato de câmara (como as espécies do gênero *Annona*) apresentam termogênese, que é a  
144 elevação da temperatura no interior da câmara floral (Gottsberger 1988, 1989, 2012;  
145 Gottsberger & Silberbauer-Gottsberger 2006), o que favorece a liberação de odores pelas  
146 flores, um atributo muito comum em espécies cantarófilas (Jürgens et al. 2000; Silberbauer-  
147 Gottsberger et al. 2003; Gottsberger & Silberbauer-Gottsberger 2006; Ratnayake et al. 2007;  
148 Gottsberger 2012; Paulino-Neto 2014).

149         Recentemente, Favaris et al. (2020) demonstraram que *C. paraguayensis* são atraídos  
150 pelos voláteis das flores de *Lagenaria siceraria* (Cucurbitaceae), a qual é visitada por diversas  
151 espécies de insetos, entre eles, os esfingídeos. (Morimoto et al. 2004). Dentre os compostos  
152 presentes em seu buquê de voláteis, está o nerolidol, um composto comumente associado às  
153 flores esfingófilas (Knudsen & Tollsten 1993), e que também compõe a “imagem floral  
154 branca” de espécies polinizadas por mariposas (Kaiser 1991). Além de *L. siceraria* (Favaris et  
155 al. 2020), *C. paraguayensis* também foi registrado visitando outras espécies não cantarófilas,  
156 como *Kielmeyera variabilis* (Calophyllaceae) e *Bauhinia curvula* (Fabaceae) (Gottsberger  
157 1986; Munin et al. 2008).

158         Apesar de não haver registros de esfingídeos visitando as populações de *M.*  
159 *longiflora* no Brasil, suas características florais sugerem uma adaptação primária à  
160 esfingofilia (Moré et al. 2007). Entretanto, nossas observações em campo ao longo da  
161 distribuição da espécie no Cerrado do Brasil mostram que além da visitação frequente destas

162 flores por besouros Cyclocephalini, que consomem alguns tecidos florais (veja também  
163 Gottsberger & Silberbauer-Gottsberger 2006), a espécie produz frutos sob condições naturais.

164       Herbívoros florais podem ser atraídos pelos mesmos compostos voláteis que atraem  
165 os polinizadores de uma espécie (Baldwin et al. 1997; Theis 2006; Andrews et al. 2007;  
166 Nunes et al. 2018), e besouros herbívoros eventualmente podem atuar como polinizadores  
167 (Nunes et al. 2016). Adicionalmente, sabemos que o besouro Cyclocephalini, *Cyclocephala*  
168 *paraguayensis*, atua como visitante frequente de espécies não cantarófilas (Gottsberger 1986;  
169 Munin et al. 2008; Favaris et al. 2020), e que podem ser atraídos por voláteis associados a  
170 atração de esfingídeos (Favaris et al. 2020). Dessa forma, neste estudo nós analisamos se o  
171 principal visitante floral de *M. longiflora*, i.e., besouros do gênero *Cyclocephala*  
172 (Melolonthidae, Dynastinae), são atraídos pelos mesmos voláteis florais responsáveis pela  
173 atração dos supostos polinizadores primários da espécie, i.e., esfingídeos, resultando em um  
174 importante *trade-off* envolvendo a atração de polinizadores e herbívoros florais (Baldwin et  
175 al. 1997; Theis 2006; Andrews et al. 2007; Nunes et al. 2016). Além disso, nós também  
176 analisamos o papel dos besouros sobre a reprodução de *M. longiflora* para testar se estes  
177 besouros podem atuar como polinizadores efetivos da espécie.

178       Nesse contexto, nós estudamos a biologia floral e o sistema reprodutivo de *M.*  
179 *longiflora*, para testar se a espécie depende de polinizadores para a sua reprodução,  
180 determinar os polinizadores, e analisar se a espécie está sujeita à limitação polínica.  
181 Adicionalmente, nós também realizamos experimentos de exclusão para analisar se os  
182 besouros Cyclocephalini polinizam a espécie na ausência de esfingídeos. Para analisar se  
183 esfingídeos atuam como visitantes florais e polinizadores efetivos de *M. longiflora*, e em qual  
184 frequência ocorreriam tais visitas, nós realizamos observações focais diretas e por meio de  
185 câmeras equipadas com luz infravermelha (que permite a visão noturna) e ativadas por calor e  
186 movimento (conforme Johnson et al. 2019 e Amorim et al. 2021). Finalmente, nós também

caracterizamos a composição química dos compostos orgânicos voláteis produzidos pelas flores de *M. longiflora*, e por meio de experimentos em campo, testamos se os besouros Cyclocephalini são atraídos pelos principais voláteis florais produzidos pela espécie.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Área de Estudo**

O trabalho foi realizado na Unidade de Proteção Integral Floresta Estadual de Botucatu (22°56' S, 48°27' O), que abrange uma área total de 33,8 hectares de Cerrado. Segundo a classificação do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (2012) a vegetação no interior dessa área compreende savana arborizada e savana gramíneo-lenhosa, com mata-de-galeria ao longo do córrego que delimita a área a leste. O estudo foi desenvolvido na área de campo cerrado que compreende *ca.* 17 ha. do total da vegetação da área de estudos, na qual a população de *Mandevilla longiflora* ocorre em maior densidade e abundância.

### **Biologia floral e sistema reprodutivo**

A antese floral de *M. longiflora* foi registrada em 12 flores marcadas e observadas desde a abertura até a senescência, que foi caracterizada pela abscisão e queda da corola. Adicionalmente, quantificamos o número de flores por indivíduo em 100 plantas e medimos o comprimento do tubo floral em três flores por planta. Em alguns desses indivíduos medimos apenas uma ( $n = 9$ ) ou duas flores ( $n = 34$ ), pois os demais botões florais ainda estavam em desenvolvimento. No total, foram analisadas 247 flores.

Para entender se a baixa frequência de esfingídeos poderia estar relacionada à produção de néctar na espécie, nós também caracterizamos a produção do néctar na espécie por meio da análise do volume, concentração e massa de açúcares produzida no néctar de *M. longiflora*. O néctar foi analisado em dois grupos experimentais, a partir de flores recém-

abertas e não visitadas. No primeiro grupo (“remoção”,  $n = 19$  flores) nós removemos o néctar no momento da abertura da flor, que foi em seguida isolada com sacos de organza de náilon por um período de 24 horas, quando o néctar acumulado foi novamente removido. No segundo grupo (“acumulado”,  $n = 20$  flores), as flores foram isoladas na fase de pré-antese, e o néctar removido após um período de 24h. O volume do néctar foi extraído com uma microseringa graduada acoplada com uma agulha customizada (Hamilton, NV, USA) de 15 cm de comprimento, o que possibilitou a remoção do néctar na base do tubo floral sem danificar a flor. A concentração de açúcares no néctar (porcentagem de sacarose, massa/massa) foi aferida com refratômetro manual (0–90%; Instrutherm - RT-280). Para calcular a massa de açúcares (mg), os valores de concentração foram convertidos em miligramas de açúcar presentes em um  $\mu\text{L}$  de néctar seguindo Galetto & Bernardello (2005).

Para analisar o sistema reprodutivo da espécie e avaliar a sua dependência em relação aos polinizadores, nós realizamos experimentos de polinização controlada entre os meses de fevereiro e abril de 2018, e entre setembro e dezembro nos anos de 2018, 2019 e 2020. Para isso foram realizados os seguintes experimentos de polinização controlada: controle, no qual 255 flores ( $n = 160$  plantas) foram marcadas para analisar a formação de frutos sob condições naturais (acessível aos polinizadores); autopolinização espontânea, no qual 60 botões florais ( $n = 55$  plantas) foram mantidos isolados com sacos de organza de náilon sem qualquer manipulação; autopolinização manual, na qual 84 flores ( $n = 75$  plantas) recém-abertas foram autopolinizadas manualmente; e polinização cruzada, no qual 80 flores ( $n = 79$  plantas) recém-abertas receberam pólen de outras plantas da população. As polinizações manuais foram realizadas utilizando uma haste de grama para remover o pólen e depositar no estigma (veja [Vídeo material suplementar 1](#)).

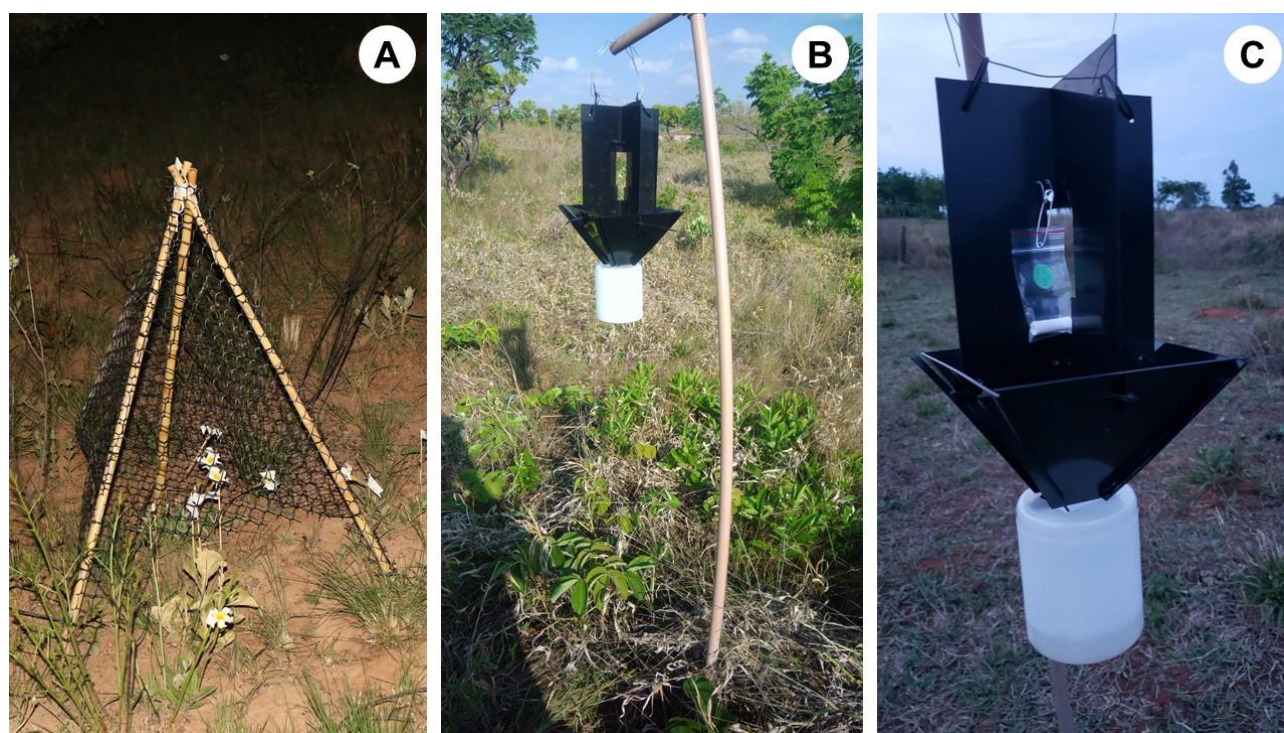
## **Visitantes florais e experimento de exclusão**

Para a observação dos visitantes florais e potenciais polinizadores, foram realizadas ao todo 179 horas e 36 minutos de observações focais em campo para o registro e análise do comportamento dos visitantes florais. Durante o dia, as observações foram realizadas no período da manhã entre 05:30h e 08:30h e no período da tarde a partir das 15:30 horas, por dois observadores. À noite, realizamos as observações diretas entre 19:00 h e 23:00h. Em anos anteriores, realizamos 25 horas de observações diretas, mas que não entraram no cálculo de frequência de visitas por não termos o número exato de flores observadas. Para os besouros focamos no horário de chegada à flor e tempo de permanência, assim como o percentual de flores ocupadas na população. Alguns besouros foram coletados e encaminhados para um especialista para a identificação ao nível de espécie. Nós observamos o comportamento dos besouros nas flores de *M. longiflora* em relação às partes florais consumidas e tocadas por estes insetos durante o seu período de permanência na flor.

Para analisar se os esfingídeos visitavam as flores, além das observações focais diretas em campo, nós também realizamos observações indiretas por meio do uso de câmeras de visão noturna ativadas por calor e movimento (Bushnell Nature View, modelo 119740, Bushnell Corporation, Overland Park, Kansas). Tais câmeras permitem a realização de observações mais acuradas e por um período muito superior ao que observadores poderiam permanecer no campo (Johnson et al. 2019; Amorim et al. 2021), e assim permitem quantificar a frequência de visitação de esfingídeos às flores por longos períodos. Tais câmeras utilizam detecção de infravermelho passivo (*passive-infrared detection* – PIR) e podem registrar esfingídeos, uma vez que a temperatura torácica dessas mariposas em voo varia entre 31 e 36 °C (Heinrich 1993; Jonhson et al. 2019). As câmeras foram instaladas entre 19:00h e 19:30h e colocadas a uma distância de 60 cm das flores, onde permaneceram durante todo o período noturno. Ao todo foram realizadas 173 horas e 36 minutos de observações com o uso de duas câmeras, em um total de 38 flores, distribuídas em 23 plantas

ao longo de 16 dias. O ângulo de visão das câmeras permitia a captação de três a cinco plantas, e essas filmagens foram feitas por períodos de 9 a 12 horas por noite, entre os meses de outubro e dezembro de 2020.

Para testar se os besouros atuavam efetivamente como polinizadores de *M. longiflora* nós realizamos um experimento de exclusão utilizando gaiolas cônicas (90 cm de altura e 70 cm de base) cobertas com uma tela de malha de 6 cm<sup>2</sup>, que possibilitava o livre acesso dos besouros às flores, mas impedia o acesso de esfingídeos (Fig. 1 A). Ao todo foram isoladas 99 flores distribuídas em 80 indivíduos. A gaiola permaneceu em cada planta até a senescência das flores.



**FIG. 1** Experimentos realizados em campo. **A.** Gaiola utilizada no experimento de exclusão de esfingídeos. **B.** Armadilha utilizada no experimento de atratividade de besouros. **C.** Detalhe da armadilha de atratividade mostrando o pote de captura e o sachê contendo o volátil sintético das flores de *Mandevilla longiflora*.

## Compostos Orgânicos Voláteis (COVs)



Os compostos orgânicos voláteis (COVs) foram coletados das flores diretamente no campo utilizando um sistema dinâmico de aeração (Raguso & Pellmyr 1998) em abril de 2018, no qual o ar em contato com os voláteis emitidos pela flor era capturado por um polímero adsorvente. As flores (n=5) foram individualmente envolvidas com um saco de poliéster (17 x 20 cm). Na saída do saco foi colocada uma pipeta de vidro contendo 30 mg de polímero adsorvente Hayesep-Q (80/100 mesh; Sigma-Aldrich), no qual os voláteis foram coletados pela passagem do ar (< 0,3 L/min). O fluxo de ar foi filtrado com carvão ativado na entrada dos sacos, e a passagem do ar foi realizada através de uma bomba de vácuo e pressão (2 L/min). O período de aeração foi de uma hora após a antese (19:00h – 20:00 h). Posteriormente, os COVs foram eluídos do polímero utilizando 300 µL de hexano. O mesmo procedimento de aeração foi realizado com um saco vazio para inspecionar os compostos contaminantes do sistema (controle).

Os voláteis florais foram analisados no Laboratório de Ecologia Química e Comportamento de Insetos, no Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ/USP, utilizando um cromatógrafo gasoso acoplado ao detector por ionização em chama (GC-FID; GC-2010 Shimadzu corp., Kyoto, Japão), equipado com uma coluna apolar (30 m × 25 µm × 25 mm; Rtx-1; RESTEK, Bellefonte, PA, EUA). Um microlitro do extrato natural foi injetado em modo ‘*splitless*’ a 250 °C, sendo a temperatura de forno programada a 40°C iniciais por 5 minutos, atingindo 250°C a 10°C/min. O hélio foi utilizado como gás de arraste (1,47 mL/min) em velocidade linear a 33 cm/s. Para todos os compostos florais encontrados, o índice de retenção de Kovats foi calculado (Van Den Dool & Kratz 1963). Posteriormente, foi realizada a identificação dos compostos através de outra injeção de um microlitro do extrato natural em um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massa (GC-MS; GC-2010QP Ultra, Shimadzu corp., Kyoto, Japão), e equipado com a mesma coluna do GC-FID. As amostras foram analisadas na mesma programação de temperatura descritas anteriormente

para o GC-FID. O hélio foi utilizado como gás de arraste (1,32 mL/min) em velocidade linear a 41,4 cm/s. Tanto a interface como a fonte de íons foram mantidas a 250 °C e o espectro de massas foi obtido por impacto de elétron (70 eV) no intervalo de  $m/z$  35 – 280. Os voláteis foram identificados baseados em seus índices de retenção, comparação dos espectros de massa com a biblioteca NIST 11 (Lemmon et al. 2011), e por meio de compostos sintéticos produzidos em laboratório.

### **Bioensaios de campo da atratividade dos besouros aos COVs**

Para avaliar se os besouros são atraídos pelo perfume floral produzido pelas flores de *M. longiflora*, o principal COV floral emitido pela espécie foi sintetizado em laboratório e utilizado em um bioensaio de campo conduzido em outubro de 2019, em uma área de pastagem no município de Cassilândia – MS (19°05'35,8" S, 51°48'52,5" L). Esta área foi escolhida uma vez que observações prévias apontaram a ocorrência em grande abundância da mesma espécie de Cyclocephalini presente na área de estudos em Botucatu – SP (veja Favaris et al. 2020), tornando essa área ideal para os experimentos de atratividade de besouros. O experimento de atração consistiu de um tratamento composto por armadilhas com 500 uL da solução (40 mg/mL) do composto sintético (mistura de dois isômeros na proporção de 1:1) de *M. longiflora* diluído em óleo de parafina, enquanto que o tratamento controle foi composto por 500 µL somente do óleo de parafina (solvente). Tanto o tratamento contendo os atraentes como o controle foram feitos em um sachê plástico (7 cm x 5 cm) contendo um rolo de algodão para a impregnação da solução ou solvente. As armadilhas foram feitas com poliestireno preto, e eram compostas por duas aletas (18 cm x 24 cm) encaixadas perpendicularmente e formando uma abertura central (5 cm x 10 cm) para colocação do composto químico atraente. Abaixo das aletas foi encaixado um pote coletor de insetos com

volume de 0,5 L contendo cerca de 100 ml de solução de água e detergente comum (Fig. 1 B e C).

As armadilhas foram dispostas em blocos completos casualizados, distanciadas 20 m entre si, e posicionadas a 1,5 m de altura do solo utilizando tubos de PVC em L inseridos em barras de aço fixas no solo. O VOC sintético foi colocado nas armadilhas uma hora antes do pôr do sol, quando se iniciava a revoada dos insetos (Albuquerque et al. 2016; Favaris et al. 2020). As armadilhas foram deixadas até a manhã do dia seguinte para avaliação da captura de besouros. Foram realizadas 10 repetições, e os besouros capturados foram encaminhados para um especialista para a identificação.

## **Análise de Dados**

Para analisar se ocorria limitação de pólen em *M. longiflora*, nós calculamos o índice de limitação de pólen conforme Larson & Barrett (2000). O índice de limitação de pólen (*PLI*) foi calculado como  $PLI = 1 - (Po / Ps)$ , onde *Po* é a proporção de frutos formados no tratamento controle e *Ps* é a proporção de frutos formados no tratamento de polinização cruzada. O *PLI* varia de 0 (sem limitação de pólen) a 1 (limitação de pólen extrema).

Para testar se a remoção do néctar afeta a sua produção total ao longo de um período de 24h, o volume e a massa total de açúcares foram somados no conjunto de flores que sofreu remoção no momento da abertura e 24h depois (tratamento de “remoção”). O volume e massa de açúcares do tratamento “remoção” foram comparados com aqueles do conjunto de flores que sofreu a remoção do néctar apenas 24h após a abertura das flores (tratamento “acumulado”). Finalmente, nós utilizamos um teste de Mann-Whitney para testar se o volume e massa de açúcares diferiram entre ambos os tratamentos.

## **RESULTADOS**

## Biologia floral e sistema reprodutivo

As flores de *Mandevilla longiflora* podem ser morfológicamente caracterizadas como tipicamente esfingófilas. O tubo floral infundibuliforme (flor em forma de funil, Fig. 2 A e B), com comprimento que varia de 88 mm a 128 mm (média =  $109,15 \pm 8,51$ ,  $n = 247$  flores em 100 plantas) torna a espécie funcionalmente especializada em espécies de esfingídeos com probóscide longa. As plantas produziam em média nove flores, variando entre quatro e 19 flores por estação de floração. Durante o pico de floração e em uma única noite, a população podia apresentar de 800 a 2000 flores abertas simultaneamente. O início da abertura das flores ocorreu por volta das 16:30h e até às 19:00h as flores já estavam completamente abertas. A antese teve duração de 5 a 8 dias, e a senescência foi caracterizada pela abscisão da corola. As flores permaneciam abertas durante a noite, fechavam-se durante o dia e reabriam ao entardecer (por volta das 17h30 - 18h30) dos dias seguintes ao longo de todo período de antese.

A produção do perfume floral teve início no começo da noite, após a completa abertura da flor. O odor produzido tinha um cheiro cítrico, leve e adocicado, e diminuía ao longo da noite até tornar-se praticamente imperceptível ao olfato humano não treinado. Os frutos começaram a se desenvolver em torno de 8 a 12 dias após a polinização, com o término do desenvolvimento e dispersão das sementes ocorrendo em torno de 40 a 50 dias após a polinização.

Os experimentos de polinizações controladas demonstraram que *M. longiflora* formou frutos apenas após os tratamentos de autopolinização manual, polinização cruzada, e sob condições naturais. Não houve a formação de frutos por autopolinização espontânea (Tabela 1). O índice de limitação polínica observado foi de 0,69. Não houve diferença significativa na produção de néctar entre as flores que sofreram duas remoções sucessivas (momento da abertura floral e após 24h) e aquelas que sofreram apenas uma remoção após o

período de 24h (Fig. 3; volume:  $W = 164$ ,  $p = 0.4736$ ; massa de açúcares:  $W = 134$ ,  $p = 0.1197$ ).

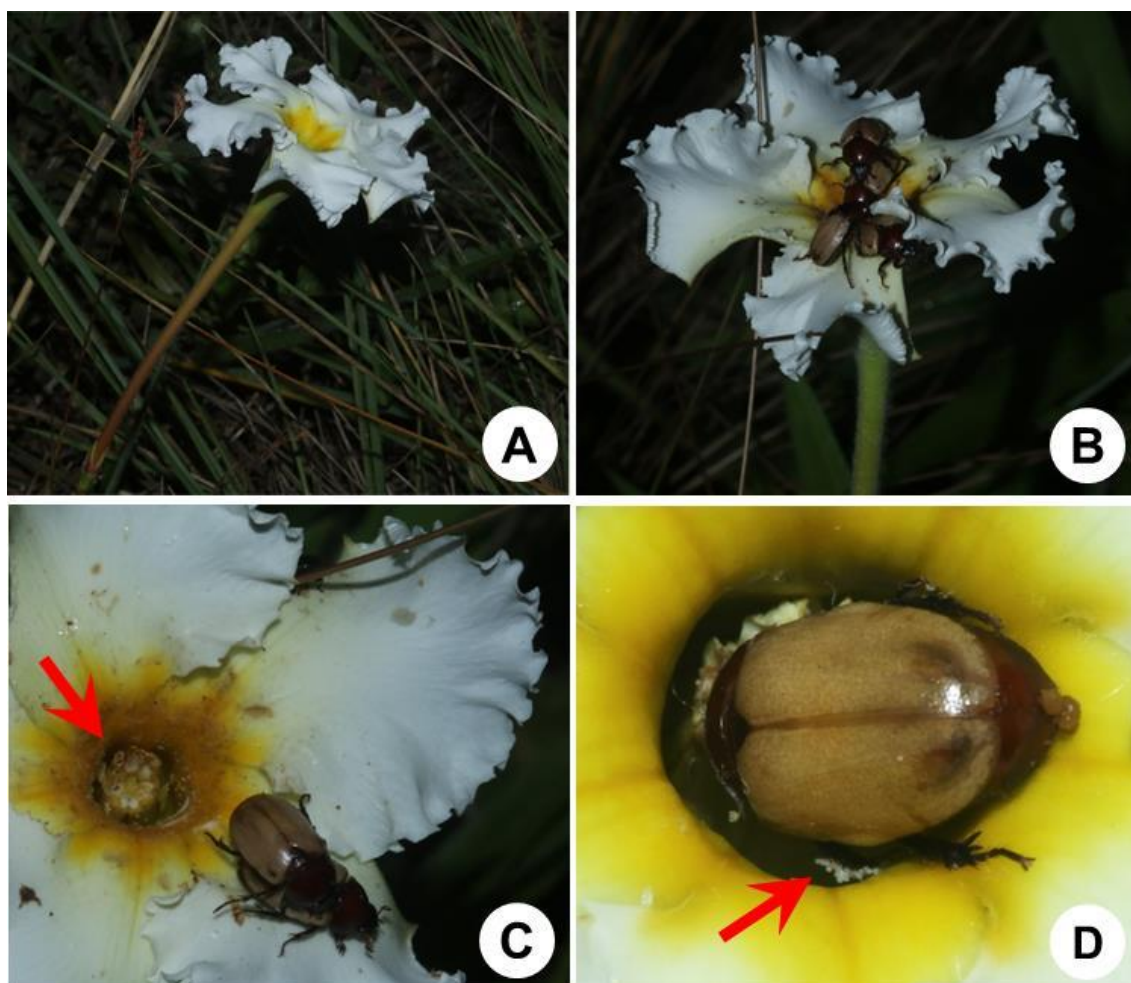
### **Visitantes florais e experimento de exclusão**

Besouros da espécie *Cyclocephala paraguayensis* Arrow, 1903 foram os visitantes florais mais frequentes de *Mandevilla longiflora*. Durante o pico da floração (final de outubro/início de novembro de 2020) a frequência de flores ocupadas por besouros foi de 47,8% (632/1322 flores amostradas, Fig. 2 B - D). A morfologia infundibuliforme da flor de *M. longiflora*, com uma pequena expansão na parte superior, era comumente utilizada por *C. paraguayensis* como local de abrigo e cópula. Os besouros consumiam as anteras e o pólen, normalmente danificando o estigma, e eventualmente o próprio tubo floral (Fig. 2 C e D). Normalmente, as flores abrigavam de um a dois besouros, mas em alguns casos até quatro besouros puderam ser encontrados em uma mesma flor (Fig. 2 B). Os besouros forrageavam nas flores a partir das 19h, e algumas flores eram ocupadas durante toda antese (*i.e.*, da abertura até a senescência). Enquanto forrageavam os tecidos florais, os besouros ficavam com pólen aderido ao corpo, particularmente pernas e élitros (Fig. 2 D), podendo carregar pólen entre as flores visitadas na população.

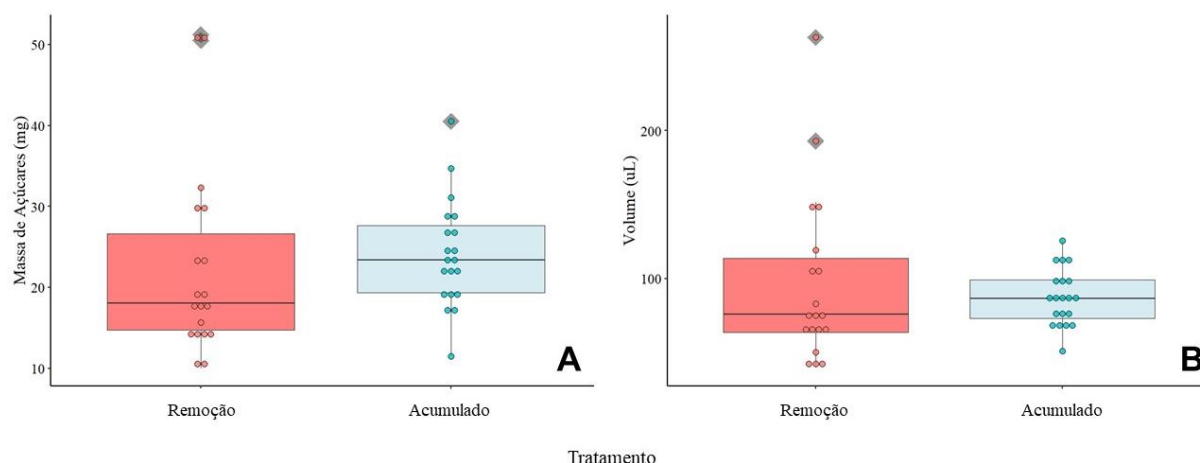
Os besouros *C. paraguayensis* foram encontrados em 19,20% (19/99 flores) das flores submetidas ao tratamento de exclusão (80 plantas, 99 flores) e nenhuma das flores visitadas apenas por besouros formou fruto, o que sugere que *C. paraguayensis* atua apenas como florívoro, não contribuindo com a reprodução de *M. longiflora*.

**TABELA 1.** Experimentos de polinização controlada realizados em uma população de *Mandevilla longiflora* em uma área de cerrado de Botucatu-SP.

| Tratamento                  | % (frutos/flores) |
|-----------------------------|-------------------|
| Condição natural (controle) | 19,60 (50/255)    |
| Autopolinização espontânea  | 0 (0/60)          |
| Autopolinização manual      | 75 (63/84)        |
| Polinização cruzada         | 65 (52/80)        |



**FIG. 2** Aspectos da biologia floral de *Mandevilla longiflora* (Desf.) Pichon (Apocynaceae) no cerrado de Botucatu – SP. **A.** Morfologia floral da espécie com destaque do longo tubo da corola (ca. 10 cm) característico de flores esfingófilas funcionalmente especializadas. **B.** Besouros *Cyclocephala paraguayensis* Arrow (Melolonthidae, Dynastinae) sobre a flor de *M. longiflora*. Como visto em **B** e **C**, os besouros utilizam as flores como local de cópula, e também consomem as anteras (seta), provavelmente em busca de pólen. **D.** Besouro sobre a flor consumindo as anteras/pólen, com massas de pólen aderidas sobre o corpo. A seta mostra uma grande massa de pólen sobre a perna. Outros besouros foram encontrados com pólen aderidos à cabeça e élitros.



**FIG. 3** Características do néctar de *Mandevilla longiflora* (Apocynaceae). **A.** Massa (mg) total de açúcares do néctar e **B.** Volume (uL) do néctar. O tratamento “Remoção” refere-se à soma do volume e da massa de açúcares aferidos do néctar extraído no momento da antese, e após 24h. Já o tratamento “Acumulado” refere-se ao néctar extraído uma única vez após um período de 24 h após a antese floral, em flores não visitadas e mantidas isoladas desde a fase de pré-antese.

Foram registradas cinco visitas de esfingídeos às flores de *M. longiflora*, totalizando uma frequência de 0,00074 visitas/flor/hora. Todas as visitas foram realizadas por *Agrius cingulata* Fabricius, 1775, uma espécie cuja probóscide tem *ca.* de 9,0 cm (Fig. 4), e ocorreram entre as 20:30h e 00:00h ([Vídeo Material Suplementar 2](#)). Os registros de vídeo também mostraram que, de fato, os esfingídeos não eram capazes de visitar as flores isoladas pelas gaiolas de exclusão ([Vídeo Material Suplementar 2](#)).



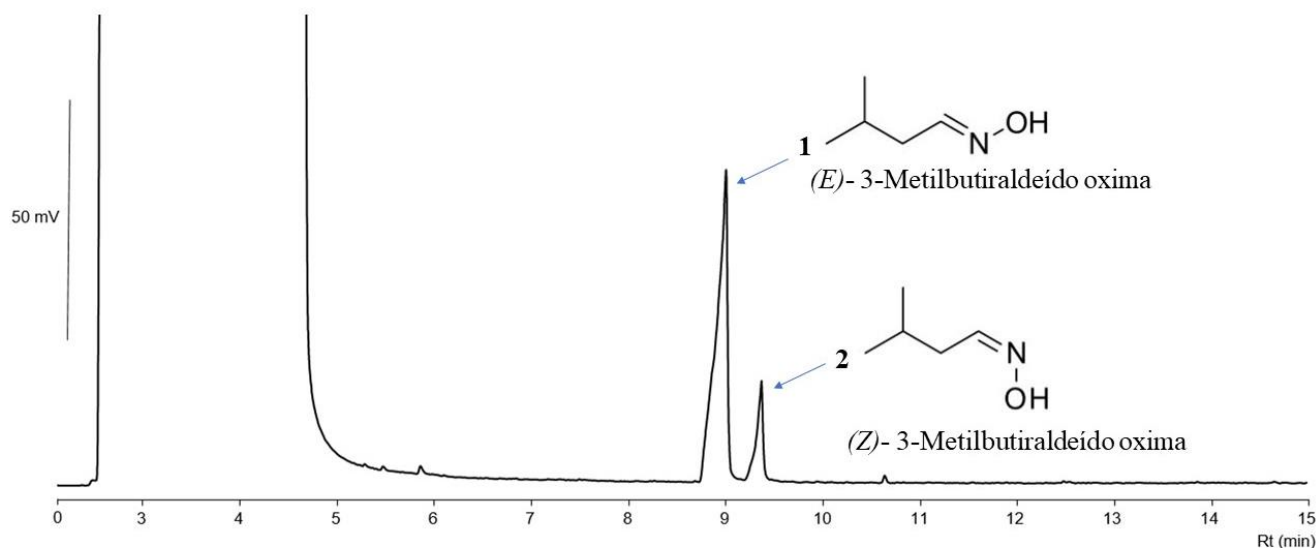
426 **FIG. 4** O esfingídeo *Agrus cingulata* Fabricius, 1775 visitando flor de *Mandevilla longiflora*  
427 no cerrado de Botucatu – SP. Na seta, é possível ver a massa de pólen aderida à probóscide da  
428 mariposa.  
429



## Compostos Orgânicos Voláteis e bioensaios de campo

Os principais compostos orgânicos voláteis produzidos por *Mandevilla longiflora* foram os isômeros (Z) e (E) de 3-metil-butiraldoxima (Fig. 5), que corresponderam a >99% dos COVs produzidos pela espécie. De acordo com os tempos de retenção, o isômero 1 corresponde ao cis e o isômero 2 corresponde ao trans, conforme Mottram & Flament (1996) (porcentagem de cada isômero na amostra: cis:  $86,63554 \pm 1,632732$ ; trans:  $13,36446 \pm 1,632732$ ). A partir deste composto foi produzida uma mistura isomérica do volátil sintético utilizada no bioensaio de campo.

Os besouros *C. paraguayensis* responderam ativamente à presença do volátil sintético no campo. Apenas as armadilhas contendo a mistura isomérica do 3-metil-butiraldoxima sintético capturaram *C. paraguayensis* (22 a 50 besouros capturados por armadilha; média =  $37,1 \pm 11,45$ , totalizando 371 besouros) ao passo que as armadilhas controle não capturaram nenhum besouro.



**FIG. 5** Análise de GC-MS dos compostos orgânicos voláteis extraídos das flores de *Mandevilla longiflora* no cerrado de Botucatu – SP.

## DISCUSSÃO

Os resultados dos experimentos de polinização controlada demonstraram que *Mandevilla longiflora* é uma espécie autocompatível, porém completamente dependente de polinizadores para a sua reprodução. Os experimentos de exclusão constataram que *C. paraguayensis* não polinizam as flores de *M. longiflora*, e atuam apenas como florívoros da espécie. Embora os esfingídeos tenham sido visitantes pouco frequentes, estas mariposas, particularmente *Agrius cingulata*, são os únicos polinizadores da espécie, tal como predito pela síndrome de polinização, apesar dos besouros *Cyclocephala paraguayensis* serem altamente atraídos pelos voláteis florais de *M. longiflora*. A atração aos voláteis florais é uma característica comum de besouros deste gênero, que são polinizadores importantes de várias espécies cantarófilas polinizadas por Cyclocephalini (Maia & Schlindwein 2006; Maia et al. 2010; Maia et al. 2012). Entretanto, este grupo de besouros também atua como florívoro em diversas espécies de palmeiras (Oliveira & Ávila 2011; Maia et al. 2018, 2020), bem como em espécies esfingófilas (Morimoto et al. 2004; Favaris et al. 2020). Esses resultados demonstram que o principal florívoro de *M. longiflora* é atraído pelos mesmos voláteis responsáveis pela atração dos polinizadores, revelando um importante *trade-off* na espécie relacionado à atração de seus polinizadores e dos principais antagonistas.

A presença de florívoros nas flores pode reduzir o *fitness* das plantas por meio da redução dos serviços de polinização (Lohman et al. 1996), uma vez que o dano floral pode interferir na emissão de voláteis atrativos (Kessler et al. 2011) e a integridade da morfologia floral (Mccall 2008; Söber et al. 2010). Como *M. longiflora* depende de um mecanismo de polinização complexo resultante da sinorganização das peças florais (Moré et al. 2007), os danos nas anteras e estigma causados pelos besouros têm um efeito negativo, na medida que afetam a estrutura da flor, o que é crucial para que a polinização possa ocorrer. Considerando que o volátil floral de *M. longiflora* se trata de um composto bastante raro, mas ainda assim

atraente para *C. paraguayensis*, a ocorrência de autocompatibilidade parece ter sido uma resposta eficiente diante da raridade dos polinizadores de uma espécie funcionalmente especializada, de forma a assegurar os serviços de polinização (Baker 1955; Fausto et al. 2001; Moeller 2006).

As flores de *M. longiflora* são infundibuliformes (flores em forma de funil), com tubo floral longo do tipo hipocrateriforme, e produzem aldoximas voláteis que pertencem à família dos compostos nitrogenados (Knudsen & Tollsten 1993). Essa família de compostos compõe a denominada “imagem floral branca”, na qual flores esfingófilas emitem uma série de voláteis atrativos às mariposas (Knudsen & Tollsten 1993; Nilsson 1983; Tollsten 1993; Kaiser 1993; Raguso & Pichersky 1995; Raguso et al. 2003). Apesar do poder de predição ser baixo para algumas síndromes de polinização (Hingston & Mcquillan 2000; Ollerton et al. 2009; Danieli-Silva et al. 2012), as características morfológicas e fisiológicas de *M. longiflora* sugerem que, para plantas esfingófilas funcionalmente especializadas, a previsibilidade da síndrome de polinização é muito elevada. Entretanto, as visitas realizadas por esfingídeos em outras espécies esfingófilas funcionalmente especializadas podem ser bastante raras (Zhang et al. 2011; Amorim et al. 2014), e os poucos registros de esfingídeos visitando *M. longiflora* realizados neste trabalho, bem como em estudos anteriores realizados na Argentina (Moré et al. 2007), demonstram como essas visitas realmente são raras e fortuitas nesta espécie.

Tendo em vista que a polinização de espécies esfingófilas funcionalmente especializadas depende da presença de mariposas com probóscide longa, a baixa frequência de *Agrius cingulata*, bem como a baixa produção de frutos sob condições naturais em relação aos cruzamentos manuais, indicam que a polinização é limitada pela escassez de polinizadores, uma vez que outras espécies do gênero *Mandevilla* possuem taxas de frutificação natural relativamente maiores do que a encontrada neste estudo, como em *M. petraea* (40%, Moré et al. 2007) e *M. tenuifolia* (30%, De Araújo et al. 2014). Embora a

frutificação em condições naturais seja baixa comparada aos cruzamentos manuais, a baixa frequência de visitas por esfingídeos ainda não seria capaz de gerar a taxa de frutificação natural observada. Assim, considerando que não registramos nenhum outro visitante como potencial polinizador, isto sugere que os nossos registros de esfingídeos visitando as flores de *M. longiflora* pode estar subestimado devido a um efeito de diluição em decorrência da elevada abundância (entre 800 e 2000) de flores abertas simultaneamente em uma mesma noite (Wenninger et al. 2016).

Espécies com morfologia floral tipicamente esfingófila restringem a polinização a apenas algumas espécies de esfingídeos com aparato bucal longo o suficiente para alcançar o néctar na base do tubo. Tendo em vista que tubos florais extremamente longos constituem um caractere derivado, cuja reversão é pouco provável (veja Whittall & Hodges 2007), a especialização estrita à polinização por esfingídeos têm sido considerada como um “beco sem saída” evolutivo (Tripp & Manos 2008), pois as transições para outros grupos de polinizadores são difíceis de ocorrer. Dessa forma, os registros indiretos de visitas de *Manduca sexta* realizados na Argentina (Moré et al. 2007) e as visitas de *A. cingulata* registradas neste estudo sugerem que *M. longiflora* é estritamente dependente de um pequeno grupo de esfingídeos com probóscide longa para a sua reprodução.

Na área de estudo existem espécies de Annonaceae que são frequentemente visitadas por besouros Cyclocephalini, sejam eles polinizadores ou florívoros (Gottsberger 1989; Maia et al. 2012; Pilon et al. 2017) e outras famílias que são visitadas por esses besouros, como Arecaceae (Pilon et al. 2017, Maia et al. 2018, 2020). No entanto, os estudos envolvendo *C. paraguayensis* não reportam nenhuma visita desses besouros nessas espécies de plantas (referencia). O consumo de partes florais é uma característica comum de espécies polinizadas ou herbivoradas por besouros, que oferecem recursos nutritivos aos seus visitantes na forma de tecidos ricos em amido, pólen e vários exsudatos estigmáticos (Gottsberger 1990; Barth

1991; Gottsberger & Silberbauer-Gottsberger 1991; Endress 1994; Bernhardt 2000). Assim, apesar da existência de diversas espécies atraentes aos besouros Cyclocephalini, *C. paraguayensis* foi observado consumido os tecidos florais apenas de *M. longiflora* na área de estudos, além de mostrar-se altamente atraído pelos voláteis florais desta espécie.

Plantas atacadas por herbívoros podem sofrer mudanças significativas tanto em seu metabolismo primário quanto no secundário, incluindo o aumento da produção de compostos tóxicos, antidigestivos e antinutritivos (Kessler & Baldwin 2002). Assim, a herbivoria pode afetar inclusive as interações planta-polinizador, uma vez que flores danificadas costumam liberar compostos voláteis repulsivos aos herbívoros (Kessler et al. 2011), que potencialmente também podem afastar os polinizadores. Além do mais, os polinizadores podem evitar flores danificadas pelos herbívoros por conta da alteração das pistas visuais (Raguso & Willis 2005) ou para evitar o contato com os herbívoros nas flores (Lohmann et al. 1996).

Espécies com sistema de polinização funcionalmente especializados são comumente afetadas por limitação de pólen, particularmente quando os polinizadores ocorrem em baixa densidade (Knight et al. 2005; Vamosi et al. 2006; Amorim et al. 2014). O nível de limitação polínica observado em *M. longiflora* é considerado alto e próximo aos valores observados em espécies esfingófilas especializadas na Mata Atlântica (Amorim et al. 2014), e consideravelmente maior do que aqueles observados para outras flores especializadas não polinizadas por esfingídeos (Larson & Barrett 2000). Apesar de não termos encontrado efeito de remoção dos polinizadores sobre o total de néctar produzido, o volume e quantidade de néctar como um todo é bastante compatível com os requerimentos energéticos de esfingídeos, cujo comprimento da probóscide está diretamente relacionado ao seu tamanho corpóreo (Agosta & Janzen 2005), o que reflete a elevada demanda energética destas mariposas (Heinrich 1983). Entretanto, a abundância de *M. longiflora* na área de estudo é alta, o que pode sugerir que o serviço de polinização realizado por *A. cingulata* é extremamente eficiente,

547 uma vez que a frutificação é favorecida pela ocorrência de autocompatibilidade (Baker 1955;  
548 Fausto et al. 2001; Moeller 2006).

549 Considerando a dependência estrita de polinizadores para o sucesso reprodutivo, a  
550 autocompatibilidade apresentada por *Mandevilla longiflora*, a baixa frequência de esfingídeos  
551 visitando a população estudada, associado ao comportamento dos besouros *Cyclocephala*  
552 *paraguayensis*, bem como de sua resposta aos voláteis produzidos pelas flores, este trabalho  
553 mostra que as interações planta-esfingídeo-besouro são mediadas pelos voláteis florais  
554 produzidos por *M. longiflora*, resultando em um importante *trade-off* entre a atração de  
555 polinizadores e dos principais florívoros. Outras espécies visitadas por esfingídeos também  
556 são visitadas por *C. paraguayensis*, como *Brugmansia suaveolens* (Favaris, 2021), *Lagenaria*  
557 *siceraria* (Favaris et al. 2020) e *Bauhinia curvula* (Munin et al. 2008). Assim, a alta  
558 abundância de *C. paraguayensis* nas flores de *M. longiflora* e sua alta atração aos voláteis  
559 florais da espécie demonstram que o comportamento desses besouros é bem diferente de  
560 outros Cyclocephalini, atuando como um florívoro de espécies comumente visitadas por  
561 esfingídeos. Embora essa interação possa ser prejudicial para o *fitness* de *M. longiflora*, a  
562 presença de autocompatibilidade permite com que as visitas de esfingídeos, ainda que pouco  
563 frequentes, sejam eficientes, uma vez que poucos eventos de visita irão resultar na produção  
564 de frutos e sementes.

565 Neste estudo demonstramos como esses florívoros são altamente atraídos aos  
566 voláteis sintéticos de *M. longiflora*. Mas seriam necessários novos experimentos em campo  
567 para avaliar a atratividade desses voláteis aos esfingídeos. Além disso, também seria  
568 importante testar a atratividade dos isômeros separadamente e em misturas isoméricas com  
569 diferentes proporções, de modo a avaliar a intensidade de atração de cada componente dos  
570 VOCs de *M. longiflora* aos distintos visitantes da espécie, *i.e.*, mutualistas e antagonistas.

571

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- Albuquerque LSCD, Grossi PC, Iannuzzi L (2016) Flight patterns and sex ratio of beetles of the subfamily Dynastinae (Coleoptera, Melolonthidae). *Revista Brasileira de Entomologia* 60:248-254.
- Amorim FW, Marino S, Sanz-Veiga PA, Ollerton J, Oliveira PE (2021) Short flowers for long tongues: specialization for hawkmoth pollination in the South American asclepiad *Schubertia grandiflora*. *Biotropica*. No prelo.
- Amorim FW, Wyatt GE, Sazima M (2014) Low abundance of long-tongued pollinators leads to pollen limitation in four specialized hawkmoth-pollinated plants in the Atlantic Rain forest, Brazil. *Naturwissenschaften* 101:893-905.
- Andersson S, Nilsson LA, Groth I, Bergström G (2002) Floral scents in butterfly-pollinated plants: possible convergence in chemical composition. *Botanical Journal of the Linnean Society* 140:129-153.
- Andrews ES, Theis N, Adler LS (2007) Pollinator and herbivore attraction to Cucurbita floral volatiles. *Journal of chemical ecology* 33:1682-1691.
- Baker HG (1955) Self-compatibility and establishment after 'long-distance' dispersal. *Evolution* 9:347-349.
- Baker HG (1961) The adaptation of flowering plants to nocturnal and crepuscular pollinators. *The Quarterly Review of Biology* 36:64-73.
- Baldwin IT, Preston C, Euler M, Gorham D (1997) Patterns and consequences of benzyl acetone floral emissions from *Nicotiana attenuata* plants. *Journal of Chemical Ecology* 23:2327-2343.
- Barban JR (1985) Revisão taxonomica do genero *Macrosiphonia* Muell.-Arg.(apocynaceae) Dissertação (mestrado), Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, SP.

- Barfod A, Henderson A, Balslev H (1987) A note on the pollination of *Phytelephas microcarpa* (Palmae). *Biotropica* 19:191-192.
- Barth FG (1985) *Insects and flowers. The biology of a partnership*. George Allen & Unwin.
- Beach JH (1982) Beetle pollination of *Cyclanthus bipartitus* (Cyclanthaceae). *American Journal of Botany* 69:1074-1081.
- Bernhardt P (2000) Convergent evolution and adaptive radiation of beetle-pollinated angiosperms. *Pollen and pollination* 293-320.
- Brantjes NBM (1978) Sensory responses to flowers in night-flying moths. 13-19.
- Camargo AJA, Camargo WRF, Corrêa D, Vilela MDF, Amorim FW (2018) Mariposas polinizadoras do cerrado: identificação, distribuição, importância e conservação. Embrapa Cerrados, Livro técnico (INFOTECA-E).
- Chittka L, Raine NE (2006) Recognition of flowers by pollinators. *Current opinion in plant biology* 9:428-435.
- Danieli-Silva A, Souza JMT, Donatti AJ, Campos RP, Vicente-Silva J, Freitas L, Varassin IG (2012) Do pollination syndromes cause modularity and predict interactions in a pollination network in tropical high-altitude grasslands? *Oikos* 121:35-43.
- Darwin C (1877) *On the various contrivances by which British and foreign orchids are fertilised by insects*. John Murray.
- De Araújo LDA, Quirino ZGM, Machado IC (2014) High specialisation in the pollination system of *Mandevilla tenuifolia* (JC Mikan) Woodson (Apocynaceae) drives the effectiveness of butterflies as pollinators. *Plant Biology*, 16(5), 947-955.
- Delpino F (1868–1875) Ulteriori osservazione sulla dicogamia nel regno vegetale. Part I (1868–69), Part II fasc, v. 1, 1870.
- Dieringer G & Espinosa SJE (1994) Reproductive ecology of *Magnolia schiedeana* (Magnoliaceae), a threatened cloud forest tree species in Veracruz, Mexico. *Bulletin of the torrey botanical club*, 154-159.



- Dieringer G, Cabrera RL, Lara M, Loya L & Reyes-Castillo P (1999) Beetle pollination and floral thermogenicity in *Magnolia tamaulipana* (Magnoliaceae). *International Journal of Plant Sciences*, 160(1), 64-71.
- Dobson HE (2017) Floral volatiles in insect biology. *Insect-plant interactions* 47-82.
- Dötterl S, David A, Boland W, Silberbauer-Gottsberger I & Gottsberger G (2012) Evidence for behavioral attractiveness of methoxylated aromatics in a dynastid scarab beetle-pollinated Araceae. *Journal of Chemical Ecology*, 38(12), 1539-1543.
- Endress PK (1996) *Diversity and evolutionary biology of tropical flowers*. Cambridge University Press.
- Euler M, Baldwin IT (1996) The chemistry of defense and apparency in the corollas of *Nicotiana attenuata*. *Oecologia* 107:102-112.
- Faegri K & Van der Pijl L (1979). *Principles of pollination ecology*. Elsevier.
- Farré-Armengol G, Filella I, Llusia J, Peñuelas J (2013) Floral volatile organic compounds: Between attraction and deterrence of visitors under global change. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 15:56-67.
- Fausto Jr 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.
- Favaris AP (2021) Semiochemicals associated with the reproductive behavior of *Cyclocephala paraguayensis* Arrow. Thesis presented to obtain the degree of Doctor in Science. Area: Entomology, Piracicaba.
- Favaris AP, Túler AC, Silva WD, Rodrigues SR, Leal WS, Bento JM (2020) (3 S, 6 E)-nerolidol-mediated rendezvous of *Cyclocephala paraguayensis* beetles in bottle gourd flowers. *Plos one* 15:e0235028.
- Galetto L, Bernardello G (2004) Floral nectaries, nectar production dynamics and Chemical composition in six *Ipomoea* species (Convolvulaceae) in relation to pollinators. *Annals of botany* 94:269-280.

- 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) Rewards in flowers: Nectar. In: Dafni A, Kevan PG, Husband BC (eds.) *Practical pollination biology*. Cambridge, Enviroquest Ltd 261-313.
- Gallo D, Nakano O, Silveira Neto S, Carvalho RL, Batista GD, Berti Filho E, Vendramim JD (1988) *Manual de entomologia agrícola* (p. 649). São Paulo, Agronômica Ceres.
- Gegear RJ (2001) The effect of variation among floral traits on the flower constancy of pollinators. *Cognitive ecology of pollination*.
- Gilbert LE (1972). Pollen feeding and reproductive biology of *Heliconius* butterflies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 69(6), 1403-1407.
- Gillott C (2005). *Entomology*. 3rd edition. Springer, 834pp
- Gómez JM, Zamora R (2006) Ecological factors that promote the evolution of generalization in pollination systems. *Plant–pollinator interactions: from specialization to generalization* 145-166.
- Gottsberger G (1989) Beetle pollination and flowering rhythm of *Annona* spp. (Annonaceae) in Brazil. *Plant Systematics and Evolution* 167:165-187.
- Gottsberger G, Silberbauer-Gottsberger I, Seymour RS, Dötterl S (2012) Pollination ecology of *Magnolia ovata* may explain the overall large flower size of the genus. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 207:107-118.
- Gottsberger G, Silberbauer-Gottsberger I & Dötterl S (2013) Pollination and floral scent differentiation in species of the *Philodendron bipinnatifidum* complex (Araceae). *Plant Systematics and Evolution*, 299(4), 793-809.
- Gottsberger G (1990) Flowers and beetles in the South American tropics. *Botanica Acta* 103:360-365.
- Gottsberger G (2012) How diverse are Annonaceae with regard to pollination? *Botanical Journal of the Linnean Society* 169:245-261.

- Gottsberger G, Silberbauer-Gottsberger I (2006) Life in the Cerrado: pollination and seed dispersal (Vol. 2). Reta Verlag.
- Gottsberger G, Silberbauer-Gottsberger I (1991) Olfactory and visual attraction of *Erioscelis emarginata* (Cyclocephalini, Dynastinae) to the inflorescences of *Philodendron selloum* (Araceae). *Biotropica* 23:23-28.
- Gottsberger G (1977) Some aspects of beetle pollination in the evolution of flowering plants. In *Flowering Plants*, Springer, Vienna 211-226.
- Gottsberger G (1986) Some pollination strategies in neotropical savannas and forests. *Plant Systematics and Evolution* 152:29-45.
- Gottsberger G (1988) The reproductive biology of primitive angiosperms. *Taxon* 37:630-643.
- Goulson D (2000) Are insects flower constant because they use search images to find flowers? *Oikos* 88:547-552.
- Goulson D (1999) Foraging strategies of insects for gathering nectar and pollen, and implications for plant ecology and evolution. *Perspectives in plant ecology, evolution and systematics* 2:185-209.
- Grindeland JM, Sletvold N, Ims RA (2005) Effects of floral display size and plant density on pollinator visitation rate in a natural population of *Digitalis purpurea*. *Functional Ecology* 19:383-390.
- Haber WA, Frankie GW (1989) A tropical hawkmoth community: Costa Rican dry forest Sphingidae. *Biotropica*, 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, Boeke L (2006) Relationships between the density and diversity of floral resources and flower visitor activity in a temperate grassland community. *Ecological Entomology* 31:532-538.
- Heinrich B (1983) Insect foraging energetics. In 'Handbook of experimental pollination biology' (Eds CE Jones, RJ Little) 187–214.

- Heinrich B (1993) *The hot-blooded insects: strategies and mechanisms of thermoregulation*. Harvard University Press.
- Henderson A (1986) A review of pollination studies in the Palmae. *The Botanical Review* 52:221-259.
- Hingston AB, Mc Quillan PB (2000) Are pollination syndromes useful predictors of floral visitors in Tasmania? *Austral Ecology* 25:600-609.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (2012) *Manual técnico da vegetação brasileira: sistema fitogeográfico, inventário das formações florestais e campestres, técnicas e manejo de coleções botânicas, procedimentos para mapeamentos*. Rio de Janeiro: IBGE – Diretoria de Geociências.
- Johnson SD, Balducci MG, Bijl A, Castañeda-Zárate M, Cozien RJ, Ortmann CR, Van der Niet T (2019) From dusk till dawn: camera traps reveal the diel patterns of flower feeding by hawkmoths. *Ecological Entomology* 45:751-755.
- Johnson SD, Moré M, Amorim FW, Haber WA, Frankie GW, Stanley DA, Raguso RA (2017) The long and the short of it: a global analysis of hawkmoth pollination niches and interaction networks. *Functional Ecology* 31:101-115.
- Jürgens A, Webber AC, Gottsberger G (2000) Floral scent compounds of Amazonian Annonaceae species pollinated by small beetles and thrips. *Phytochemistry* 55:551-558.
- Kaiser RAJ (1993) On the scent of orchids. Bioactive volatile compounds from plants. *Acs. Sym. Ser* 525:240-268.
- Kessler A, Baldwin IT (2002) Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. *Annual review of plant biology* 53:299-328.
- Kessler A, Halitschke R, Poveda K (2011) Herbivory-mediated pollinator limitation: negative impacts of induced volatiles on plant–pollinator interactions. *Ecology* 92:1769-1780.
- Kessler D, Diezel C, Clark DG, Colquhoun TA, Baldwin IT (2013) *Petunia* flowers solve the defence/apparency dilemma of pollinator attraction by deploying complex floral blends. *Ecology letters* 16:299-306.

- Knight TM, Steets JA, Vamosi JC, Mazer SJ, Burd M, Campbell DR, Dudash MR, Johnston MO, Mitchell RJ, Ashman TL (2005) Pollen limitation of plant reproduction: pattern and process. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 36:467-497.
- Knudsen JT, Tollsten L (1993) Trends in floral scent chemistry in pollination syndromes: floral scent composition in moth-pollinated taxa. *Botanical Journal of the Linnean Society* 113:263-284.
- Koch I, Rapini A, Simões AO, Kinoshita LS, Spina AP, Castello ACD (2015) Apocynaceae In Lista de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
- Larson BM, Barrett SC (2000) A comparative analysis of pollen limitation in flowering plants. *Biological journal of the Linnean Society* 69:503-520.
- Lawrence JF (1991) Coleoptera, Larval Key. *Immature insects*, 2:184-298.
- Lemmon EW (2011) NIST chemistry WebBook, Nist standard reference database number 69. National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg.
- Lohman DJ, Zangerl AR, Berenbaum MR (1996) Impact of floral herbivory by parsnip webworm (Oecophoridae: *Depressaria pastinacella* Duponchel) on pollination and fitness of wild parsnip (Apiaceae: *Pastinaca sativa* L.). *American Midland Naturalist* 407-412.
- Maia ACD, Dötterl S, Kaiser R, Silberbauer-Gottsberger I, Teichert H, Gibernau M, Navarro DMAF, Schlindwein C, Gottsberger G (2012) The key role of 4-methyl-5-vinylthiazole in the attraction of scarab beetle pollinators: a unique olfactory floral signal shared by Annonaceae and Araceae. *Journal of chemical ecology* 38:1072-1080.
- Maia ACD, Gibernau M, Carvalho AT, Gonçalves EG & Schlindwein C (2013) The cowl does not make the monk: scarab beetle pollination of the Neotropical aroid *Taccarum ulei* (Araceae: Spathicarpeae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 108(1), 22-34.
- Maia ACD, Reis LK, Navarro DMAF, Aristone F, Colombo CA, Carreño-Barrera J, ... Santos GKN (2020) Chemical ecology of *Cyclocephala forsteri* (Melolonthidae), a threat to macauba oil palm cultivars (*Acrocomia aculeata*, Arecaceae). *Journal of Applied Entomology*, 144(1-2), 33-40.

- Maia ACD, Santos GKN, Gonçalves EG, Navarro DMDAF, Nuñez-Avellaneda LA (2018) 2-Alkyl-3-methoxypyrazines are potent attractants of florivorous scarabs (Melolonthidae, Cyclocephalini) associated with economically exploitable Neotropical palms (Arecaceae). *Pest management science*, 74(9), 2053-2058.
- Maia ACD, Schlindwein C (2006) *Caladium bicolor* (Araceae) and *Cyclocephala celata* (Coleoptera, Dynastinae): A well-established pollination system in the northern Atlantic rainforest of Pernambuco, Brazil. *Plant Biology* 8:529-534.
- Maia ACD, Schlindwein C, Navarro DMAF, Gibernau M (2010) Pollination of *Philodendron acutatum* (Araceae) in the Atlantic forest of northeastern Brazil: a single scarab beetle species guarantees high fruit set. *International Journal of Plant Sciences* 171:740-748.
- Martins DJ, Johnson SD (2013) Interactions between hawkmoths and flowering plants in East Africa: polyphagy and evolutionary specialization in an ecological context. *Biological Journal of the Linnean Society* 110:199-213.
- McCall AC (2008) Florivory affects pollinator visitation and female fitness in *Nemophila menziesii*. *Oecologia* 155:729-737.
- 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.
- Mondino EA, López AN, Castillo HA, Carmona DM (1997). Ciclo de vida de *Cyclocephala signaticollis* Burmeister, 1847 (Coleoptera: Scarabaeidae: Dynastinae) y su relación con los factores ambientales. *Elytron* 11:145-156.
- 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:e41878.
- 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* 94:485-504.
- Morimoto Y, Gikungu M, Maundu P (2004) Pollinators of the bottle gourd (*Lagenaria siceraria*) observed in Kenya. *International Journal of Tropical Insect Science* 24:79-86.
- Mottram HR, Flament IA (1996) The Volatile Constituents of the Flowers of the 'Silk Tree', *Albizzia julibrissin*. SPECIAL PUBLICATION-ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY, 197, 74-77.
- Müller H (1873) Probosces capable of Sucking the Nectar of *Anagræcum sesquipedale*. *Nature* 8:223-223.
- Müller H (1883) The fertilisation of flowers. Macmillan and Company.
- Munin RL, Teixeira RC, Sigrist MR (2008) Esfingofilia e sistema de reprodução de *Bauhinia curvula* Benth. (Leguminosae: Caesalpinioideae) em cerrado no Centro-Oeste brasileiro. *Brazilian Journal of Botany*, 31, 15-25.
- 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.
- Nunes CE, Peñaflor MFG, Bento JMS, Salvador MJ, Sazima M (2016) The dilemma of being a fragrant flower: the major floral volatile attracts pollinators and florivores in the euglossine-pollinated orchid *Dichaea pendula*. *Oecologia* 182:933-946.
- Oliveira HND, Ávila CJ (2011) Ocorrência de *Cyclocephala forsteri* em *Acronomia aculeata*. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 41, 293-295.
- 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 NM, Price MV, 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.
- Ollerton J, Winfree R, Tarrant S (2011) How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos* 120:321-326.
- Pacini ENMVJ, Nepi M, Vesprini JL (2003) Nectar biodiversity: a short review. *Plant Systematics and Evolution* 238:7-21.
- Paulino-Neto HF, Silva TRS, Moura CWN, Lima LCL, Santos FAR (2014) Escaravelhos e as suas flores no cerrado. *Botânica na América Latina: conhecimento, interação e difusão*, Salvador: Sociedade Botânica do Brasil 462-473.
- Penz CM & Krenn HW (2000). Behavioral adaptations to pollen-feeding in *Heliconius* butterflies (Nymphalidae, Heliconiinae): an experiment using *Lantana* flowers. *Journal of Insect Behavior*, 13(6), 865-880.
- Pereira J, Schlindwein C, Antonini Y, Maia ACD, Dötterl S, Martins C, Navarro DMAF, Oliveira R. (2014) *Philodendron adamantinum* (Araceae) lures its single cyclocephaline scarab pollinator with specific dominant floral scent volatiles. *Biological Journal of the Linnean Society* 111:679-691.
- Petanidou T, Kallimanis AS, Tzanopoulos J, Sgardelis SP, Pantis JD (2008) Long-term observation of a pollination network: fluctuation in species and interactions, relative invariance of network structure and implications for estimates of specialization. *Ecology letters* 11:564-575.
- Pilon NAL, Cava MGB, Nalon MA, Zimback L, Durigan G (2017) Riqueza, relevância e estratégias para a conservação de fisionomias campestres do cerrado no horto florestal de Botucatu, SP, Brasil. *Rev. Inst. Flor.* 29:19-37.
- Prance GT (1980) A note on the pollination of *Nymphaea amazonum* Mart. & Zucc. (Nymphaeaceae). *Brittonia* 32:505-507.
- Proctor M, Yeo P, Lack A (1996) The natural history of pollination. HarperCollins Publishers.



- Raguso RA, Levin RA, Foose SE, Holmberg MW, McDade LA (2003) Fragrance chemistry, nocturnal rhythms and pollination “syndromes” in *Nicotiana*. *Phytochemistry* 63:265-284.
- Raguso RA, Pellmyr O (1998) Dynamic headspace analysis of floral volatiles: a comparison of methods. *Oikos* 238-254.
- Raguso RA, Pichersky E (1995) Floral volatiles from *Clarkia breweri* and *C. concinna* (Onagraceae): recent evolution of floral scent and moth pollination. *Plant Systematics and Evolution* 194:55-67.
- Raguso RA, Thompson JN, Campbell DR (2015) Improving our chemistry: challenges and opportunities in the interdisciplinary study of floral volatiles. *Natural product reports* 32:893-903.
- Raguso RA, Willis MA (2005) Synergy between visual and olfactory cues in nectar feeding by wild hawkmoths, *Manduca sexta*. *Animal Behaviour* 69:407-418.
- Ratcliffe BC, Cave RDC (2006) The dynastine scarab beetles of Honduras, Nicaragua and El Salvador (Coleoptera: Scarabaeidae: Dynastinae). *Bulletin of the University of Nebraska State Museum*.
- Ratcliffe B (2003) The dynastine scarab beetles of Costa Rica and Panama (Coleoptera: Scarabaeidae: Dynastinae), *Bulletin of the University of Nebraska State Museum*, Volume 16.
- Ratnayake RMCS, Gunatilleke IAUN, Wijesundara DSA, Saunders RMK (2007) Pollination ecology and breeding system of *Xylopia championii* (Annonaceae): curculionid beetle pollination, promoted by floral scents and elevated floral temperatures. *International Journal of Plant Sciences* 168:1255-1268.
- Rech AR, Agostini K, Oliveira PE & Machado IC (Eds.) (2014). *Biologia da polinização* (p. 524). Rio de Janeiro: Projecto Cultural.
- Rosas-Guerrero V, Aguilar R, Martén-Rodríguez S, Ashworth L, Lopezaraiza-Mikel M, Bastida JM, Quesada M (2014) A quantitative review of pollination syndromes: do floral traits predict effective pollinators? *Ecology letters* 17:388-400.

- Rothschild LWRB, Jordan K (1903) A revision of the lepidopterous family Sphingidae. Hazell, Watson & Viney, Ltd.
- Scoble MJ (1992). The Lepidoptera. Form, function and diversity. Oxford University Press.
- Seymour RS, Silberbauer-Gottsberger I & Gottsberger G (2010) Respiration and temperature patterns in thermogenic flowers of *Magnolia ovata* under natural conditions in Brazil. Functional Plant Biology, 37(9), 870-878.
- Silberbauer-Gottsberger I, Gottsberger G (1975) Ueber sphingophile angiospermen brasiliens. Plant Systematics and Evolution 123:157-184.
- Silberbauer-Gottsberger I, Gottsberger G, Webber AC (2003) Morphological and functional flower characteristics of New and Old World Annonaceae with respect to their mode of pollination. Taxon 52:701-718.
- Silberbauer-Gottsberger I (1990) Pollination and evolution in palms Phytion 30:213-233.
- Silva WR, Sazima M (1995) Hawkmoth pollination in *Cereus peruvianus*, a columnar cactus from southeastern Brazil. Flora 190:339-343.
- Söber V, Moora M, Teder T (2010) Florivores decrease pollinator visitation in a self-incompatible plant. Basic and Applied Ecology 11:669-675.
- Stebbins GL (1970) Adaptive radiation of reproductive characteristics in angiosperms, I: pollination mechanisms. Annual Review of Ecology and Systematics 1:307-326.
- Stechnauer-Rohringer R, Pardo-Lozano LC (2010) Redescrición de inmaduros, ciclo de vida, distribución e importancia agrícola de *Cyclocephala lunulata* Burmeister (Coleóptera: Melolonthidae: Dynastinae) en Colombia. Boletín Científico do Museu de História Natural 14:203-220.
- Theis N, Adler LS (2012) Advertising to the enemy: enhanced floral fragrance increases beetle attraction and reduces plant reproduction. Ecology 93:430-435.
- Theis N (2006) Fragrance of Canada thistle (*Cirsium arvense*) attracts both floral herbivores and pollinators. Journal of chemical ecology 32:917-927.

- Theis N, Lerdau M, Raguso RA (2007) The challenge of attracting pollinators while evading floral herbivores: patterns of fragrance emission in *Cirsium arvense* and *Cirsium repandum* (Asteraceae). *International Journal of Plant Sciences* 168:587-601.
- Thien LB (1974) Floral biology of *Magnolia*. *American Journal of Botany* 61:1037-1045.
- Tinbergen, N (1958) *Curious naturalists*. New York, Basic Books, Inc.
- Tollsten L (1993) A multivariate approach to post-pollination changes in the floral scent of *Platanthera bifolia* (Orchidaceae). *Nordic Journal of Botany* 13:495-499.
- Tripp EA, Manos PS (2008) Is floral specialization an evolutionary dead-end? Pollination system transitions in *Ruellia* (Acanthaceae). *Evolution: International Journal of Organic Evolution* 62:1712-1737.
- Vamosi JC, Knight TM, Steets JA, Mazer SJ, Burd M, Ashman TL (2006) Pollination decays in biodiversity hotspots. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103:956-961.
- Van Den Dool H, Kratz PD (1963) A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography (No. RESEARCH).
- Van der Pijl L (1960) Ecological aspects of flower evolution. I. Phyletic evolution. *Evolution* 14:403-416.
- Van der Pijl L (1961) Ecological aspects of flower evolution. II. Zoophilous flower classes. *Evolution* 15:44-59.
- Vogel S (1954) Blütenbiologische typen als elemente der sippengliederung: dargestellt anhand der Flora Südafrikas (No. 1-4) G. Fischer.
- Waser NM, Chittka L, Price MV, Williams NM, Ollerton J (1996) Generalization in pollination systems, and why it matters. *Ecology* 77:1043-1060.
- Weiss MR (2001) Vision and learning in some neglected pollinators: beetles, flies, moths, and butterflies. *Cognitive ecology of pollination* 171-190.

- Wenninger A, Kim TN, Spiesman BJ & Gratton C (2016). Contrasting foraging patterns: Testing resource-concentration and dilution effects with pollinators and seed predators. *Insects*, 7(2), 23.
- Westerkamp CH (2004) Flores e abelhas na disputa. *Ciência hoje* 34:66-68.
- Westerkamp CH (1996) Pollen in bee-flower relations some considerations on melittophily. *Botanica Acta* 109:325-332.
- Whittall JB, Hodges SA (2007) Pollinator shifts drive increasingly long nectar spurs in columbine flowers. *Nature* 447:706-709.
- Williams NH, Whitten WM (1983) Orchid floral fragrances and male euglossine bees: methods and advances in the last sesquidecade. *The Biological Bulletin* 164:355-395.
- Willmer P (2011) *Pollination and floral ecology*. Princeton University Press.
- Wright GA, Schiestl FP (2009) The evolution of floral scent: the influence of olfactory learning by insect pollinators on the honest signalling of floral rewards. *Functional Ecology* 23:841-851.
- Young HJ (1986) Beetle pollination of *Dieffenbachia longispatha* (Araceae). *American Journal of Botany* 73:931-944.
- Zhang ZQ, Kress WJ, Xie WJ, Ren PY, Gao JY, Li QJ (2011) Reproductive biology of two Himalayan alpine gingers (*Roscoeia* spp., Zingiberaceae) in China: pollination syndrome and compensatory floral mechanisms. *Plant Biology* 13:582-589.