UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Instituto de Biologia

Curso de Ciências Biológicas – Licenciatura

Trabalho de Conclusão de Curso

Seleção fenotípica mediada por esfingídeos (Lepidoptera) em atributos florais de *Oenothera ravenii* W. Dietr. (Onagraceae)

Lis Bacchieri Duarte Cavalheiro

Pelotas, 2017

Lis Bacchieri Duarte Cavalheiro

Seleção fenotípica mediada por esfingídeos (Lepidoptera) em atributos florais de *Oenothera ravenii* W. Dietr. (Onagraceae)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Licenciada em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Cristiano Agra Iserhard

Coorientador: Dr. Jeferson Vizentin-Bugoni

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

C376s Cavalheiro, Lis Bacchieri Duarte

Seleção fenotípica mediada por esfingídeos (Lepidoptera) em atributos florais de Oenothera ravenii w. Dietr. (Onagraceae) / Lis Bacchieri Duarte Cavalheiro ; Cristiano Agra Iserhard, orientador ; Jeferson Vizentin-Bugoni, coorientador. — Pelotas, 2017.

32 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Ciências Biológicas) — Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Coevolução. 2. Display floral. 3. Polinização. 4. Seleção natural. 5. Sphingidae. I. Iserhard, Cristiano Agra, orient. II. Vizentin-Bugoni, Jeferson, coorient. III. Título.

CDD : 581.16

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

Agradecimentos

Ao Cris, por me guiar nessa caminhada, por todo apoio, motivação e paciência, mas principalmente pela coragem de encarar essa novidade junto comigo e permitir que tudo isso acontecesse.

Ao Jef, que despertou em mim o encanto por essa interação linda. Obrigada por confiar em mim nesse projeto e por dedicar tanto tempo na construção dele. Tu ampliou minhas visões não só sobre seleção fenotípica, mas sobre a pesquisa em si.

Á Andreza, por dividir comigo cada passo dado. Erramos e acertamos juntas, e nos tornamos muito mais que colegas. Muito obrigada por me ajudar a correr mais quanto eu tive desleixo, e a puxar o freio quando estive prestes a enlouquecer. Sem ti seria impossível.

Aos meus cole gas, amigos, e a todos que estiveram ao meu lado durante essa fase da minha vida. Passar por todas as dificuldades e vitórias junto de vocês deu muito sentido pra a graduação.

Aos meus professores, especialmente do Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética, que acompanharam o desenvolver desse trabalho e muitas vezes me deram sugestões sobre como prosseguir.

Agradeço ao Olivier pela disponibilidade de auxílio tanto na estatística quanto nas discussões sobre o trabalho. À Juliana, pelas incontáveis caronas e horas de trabalho de campo. À Raquel pela identificação botânica da nossa *Oenothera*. E à Bia e à Vera pela ajuda com a germinação das sementes.

Aos LELEP's, por toda ajuda em campo e laboratório. Cada semente contada, cada planta medida, cada esfingídeo coletado foi de grande importância.

Ao Rapha, que repetidas vezes me escutou falar desse trabalho, vezes emocionada, vezes desesperada, e me incentivou sempre. Tu foste fundamental. Obrigada por todos os colos, por todos os puxões de orelha, por tudo. Te amo.

Aos meu pais, por me possibilitarem crescer em contato com a natureza, e me mostrarem o quanto a vida pode ser bonita, e aos meus irmãos que dividiram isso tudo comigo. Pai, teu interesse no que eu faço me faz muito bem. Muito obrigada por procurar conhecer cada vez mais os esfingídeos e a *Oenothera*. Mãe, obrigada por se preocupar comigo e valorizar meu estudo. Violeta, faltam palavras pra agradecer a tua ajuda e a inspiração que foste pra mim ao longo de toda a vida!

Resumo

CAVALHEIRO, Lis, 2017. **Seleção fenotípica mediada por esfingídeos (Lepidoptera) em atributos florais de *Oenothera ravenii* W. Dietr. (Oenothera)** Trabalho de Conclusão de Curso, Instituto de Biologia - Graduação em Ciências Biológicas – Licenciatura, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

Polinizadores podem selecionar diferentemente fenótipos florais específicos em espécies vegetais, gerando mudanças evolutivas. *Oenothera ravenii* é uma planta anual com atributos florais adaptados a polinização por esfingídeos – mariposas de probóscide longa. O impacto dos polinizadores na evolução da morfologia floral pode ser estimado a partir da correlação entre os atributos florais e o sucesso reprodutivo do fruto correspondente. O presente trabalho investigou a existência, força e direção da seleção fenotípica em uma população de *Oenothera ravenii*, relacionando seus atributos florais com a produção e o vigor das sementes. A amostragem compreendeu dois eventos de floração da espécie. Medidas de área da corola e de profundidade do tubo floral de 137 flores foram obtidas durante as florações, além do comprimento da probóscide dos esfingídeos visitantes. O número de sementes, a porcentagem e a velocidade de germinação relativos às flores foram medidos e cada uma dessas variáveis foi correlacionada aos atributos florais através de regressões múltiplas. Flores com áreas da corola maiores apresentaram maior sucesso reprodutivo quanto ao número de sementes, indicando que a seleção fenotípica favorece flores cada vez mais vistosas. Foi encontrada seleção estabilizadora do tubo floral para a primeira floração, porém, ao observar-se isoladamente cada variável, a área da corola apresentou efeito sobre o comprimento do tubo floral. Assim, a atratividade visual foi de grande importância no processo seletivo, e não apenas a profundidade do tubo floral, como se tem predominantemente enfocado até o momento. Além disso, houve grande variação interanual da abundância de esfingídeos polinizadores, tendo sido documentado aumento da competição entre as mariposas, possivelmente com efeito no processo seletivo. O estudo sugere que somente o tamanho da prole seja dependente do fenótipo floral, não havendo relação dos atributos florais com as medidas de vigor da planta.

Palavras-chave: coevolução; display floral; polinização; seleção natural; Sphingidae.

Abstract

CAVALHEIRO, Lis, 2017. **Phenotypic selection on floral traits of the hawkmoth-pollinated *Oenothera ravenii* W. Dietr. ((Onagraceae)** Trabalho de Conclusão de Curso, Instituto de Biologia – Graduação em Ciências Biológicas – Licenciatura, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

Pollinators can select specific floral phenotypes in plant species by different ways generating evolutionary changes. *Oenothera ravenii* is an annual plant with adaptations on floral traits allowing pollination by Sphingidae – hawkmoths. Pollinators's impact on evolution of floral morphology is estimated from the correlation between the floral attributes and the reproductive success of the corresponding fruit. This study aims to investigate the existence, strength and direction of phenotypic selection in an *Oenothera ravenii* population, relating their floral traits to the seeds production and vigor. Sampling was carried out throughout two flowering periods. During these periods, 137 flowers were measured concerning the floral display and the flower-tubes depth, as well as the hawkmoths proboscis. The number of seeds, percentage and germination speed related to the flowers were assessed. These variables were correlated to the floral traits by multiple regressions. Flowers with bigger floral display had a higher number of seeds, indicating that the phenotypic selection favors more showy flowers. Stabilizer selection of the floral tube for the first flowering period was also found, but, when each variable was evaluated alone, the floral display presented influence over the floral tube. Therefore, the visual attractiveness was outstanding in the process of selection, not only the depth of the floral tube, as it shown until now. There was a great variation in the abundance of hawkmoths between the two flowering periods, suggesting an increasing in the competition among these moths, possibly affecting the selective process. The study suggests that only the offspring size is dependent on the floral phenotype, since there was no relationship of floral traits and plant vigor measurements.

Key-words: coevolution; floral display; natural selection; pollination; Sphingidae.

Sumário

1 Introdução..... 6
2 Revisão bibliográfica..... 9
3 Metodologia..... 12
3.1 Área de estudo e coleta de dados..... 12
3.2 Distribuição temporal da floração..... 12
3.3 Identificação dos esfingídeos e medição das probóscides..... 13
3.4 Medições da área da corola, profundidade do tubo floral e número de flores circundantes..... 13
3.5 Medições do número de sementes, porcentagem de germinação e índice de velocidade de germinação..... 13
3.6 Relação entre os atributos florais e o sucesso reprodutivo da espécie..... 14
4 Resultados..... 16
5 Discussão..... 20
6 Conclusões..... 23
Referências..... 24

Seleção fenotípica mediada por esfingídeos (Lepidoptera) em atributos florais de *Oenothera ravenii* W. Dietr. (Onagraceae)

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Licenciatura em Ciências Biológicas, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 06/12/2017

Banca examinadora:

.....
Prof. Dr. Cristiano Agra Iserhard
Doutor em Biologia Animal pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

.....
Prof. Dr. Raquel Lüdtke
Doutora em Botânica pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

.....
Prof. Dr. Rafael Antunes Dias
Doutor em Ecologia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

1 Introdução

A maior parte das angiospermas têm adquirido ao longo do tempo evolutivo adaptações fenotípicas que permitem a maximização da aptidão (FAEGRI & VAN DER PIJL, 1971; JOHNSON & STEINER, 2000; FENSTER et al., 2004; LAMIM-GUEDES, 2011), com pelo menos 300.000 espécies de plantas dependendo de animais para sua reprodução (OLLERTON et al., 2011). Ao servirem como vetores de transporte de pólen, os polinizadores podem promover a seleção de fenótipos florais específicos em espécies vegetais (BENITEZ-VIEYRA et al., 2014), influenciando dessa forma a variedade de cores e formas das flores na natureza e aumentando a diversidade biológica via especiação (OLLERTON et al., 2011; ASHMAN & MORGAN, 2004). Isso ocorre quando alguns indivíduos de certa população de planta são selecionados diferencialmente a partir de um caractere ou conjunto deles, implicando em alteração na frequência de determinado fenótipo entre gerações e gerando potencialmente mudanças evolutivas na espécie (BENITEZ-VIEYRA et al., 2014).

Através da medida da correlação entre os valores de um ou mais atributos florais e o sucesso reprodutivo correspondente, é possível estimar a força, a direção e a forma da seleção natural em uma população, revelando o impacto dos polinizadores na evolução da morfologia floral (LANDE & ARNOLD, 1983; BRODIE et al., 1995). Abordagens neste sentido têm recebido crescente atenção (e.g. GÓMEZ, 2000; BENITEZ-VIEYRA et al., 2006; 2009; SLETVOLD & AGREN, 2016) e incluem a estimativa de coeficientes de seleção direcional e estabilizadora como parâmetros para descrever a direção linear ou quadrática, respectivamente (LANDE & ARNOLD, 1983) e força da seleção. Além disso, é necessário considerar a natureza intrinsecamente variável da coevolução no tempo e no espaço (THOMPSON, 2005), de forma que estudos em diferentes populações e períodos de

floração provêm uma melhor compreensão de como a seleção fenotípica e o processo coevolutivo ocorrem (OLLERTON & DIAZ, 1999).

Espera-se que em sistemas na qual a síndrome de polinização seja bastante especializada, a seleção mediada por polinizadores influencie diretamente no sucesso reprodutivo das variantes fenotípicas de uma espécie (OLIVEIRA et al., 2014). As interações entre as mariposas de probóscides longas da família Sphingidae e espécies de plantas com flores tubulares longas, estritamente associadas a estes insetos, constituem uma síndrome de polinização conhecida como esfingofilia (FENSTER et. al., 2004). Devido a sua especificidade, essas interações têm sido modelo de estudos visando compreender como o processo coevolutivo ocorre (DARWIN, 1862; WASSERTHAL, 1997; SAZATORNIL et al., 2016).

Enquanto as flores com tubos mais curtos podem ser acessadas por diversas espécies de polinizadores (BENITEZ-VIEIRA et al., 2014), as flores com tubos longos tendem a se tornar ecologicamente especializadas (JOHNSON et al., 2017). Isso pode restringir as interações aos visitantes com aparelhos bucais longos, os quais se beneficiam da menor competição pelo néctar (JOHNSON et al., 2017, SAZATORNIL et al., 2016) e garantem, com maior efetividade, a reprodução da planta em questão, devido a sua fidelidade enquanto polinizadores. Portanto, a seleção mediada por polinizadores pode direcionar ao aumento do comprimento do tubo floral (OLIVEIRA et al., 2014). Este processo dá suporte para a “hipótese da correspondência morfológica” na qual esfingídeos de probóscides longas estariam associados às flores mais restritivas (i.e. corolas tubulares longas), como demonstrado para comunidades de plantas e polinizadores nas Américas (e.g. SAZATORNIL et al., 2016).

Dentre as famílias botânicas associadas aos esfingídeos, as mais estudadas na América do sul são Fabaceae, Rubiaceae, Apocynaceae e Solanaceae (SAZATORNIL et al., 2016). A família Onagraceae possui 657 espécies distribuídas em 22 gêneros, tendo como um das características a presença de tubo floral na maior parte das espécies (WAGNER et al., 2007). É dividida nas subfamílias Ludwigioideae, representada pelo único gênero *Ludwigia* L., e Onagroideae, na qual está iserido o gênero *Oenothera* L (WAGNER et al., 2007). Na região austral da América do Sul, as interações entre Sphingidae e espécies do gênero *Oenothera* constituem um sistema de estudo ideal para investigação da existência, força e

direção da seleção fenotípica mediada por polinizadores (e.g. RHODES et al., 2017). O gênero *Oentohera* inclui cerca de 130 espécies (GRIGOLETTO et al., 2010) e no Brasil está associado à região litorânea (SOUZA & LORENZI, 2008). Ainda assim, há carência de estudos da pressão exercida pelos polinizadores na evolução do gênero.

Oenothera ravenii W. Dietr. possui um conjunto de atributos florais notavelmente adaptados à esfingofilia, como corola tubular longa de cores claras, antese noturna, odor forte liberado no crepúsculo e néctar abundante produzido na base dos tubos florais (FAEGRI & VAN DER PIJL, 1971). É visitada por diversas espécies de esfingídeos, existindo ampla variação tanto na profundidade dos tubos e área da corola entre indivíduos de uma mesma população, quanto no comprimento das probóscides dos visitantes (CAVALHEIRO et al., 2016). Além disso, é uma planta anual, cujo ciclo desde a germinação até a morte ocorre no período de um ano, possibilitando portanto o estudo do processo seletivo em anos consecutivos.

Este estudo tem como objetivo investigar de que modo a área da corola e a profundidade do tubo floral estão associados à produção de sementes, taxa de germinação e velocidade de germinação de *Oenothera ravenii*, de forma a verificar a existência e direção da seleção fenotípica mediada por polinizadores sobre os atributos florais da espécie. Especificamente, testou-se a hipótese de que uma maior área da corola e uma maior profundidade do tubo estão associadas ao maior sucesso reprodutivo, indicando a existência de seleção mediada por polinizadores progressiva em direção a corolas tubulares longas e flores mais vistosas.

2 Revisão bibliográfica

Dos principais estudos que estimaram a força de seleção linear e quadrática em termos de gradientes ou diferenciais de seleção padronizados na variação natural em atributos quantitativos para populações de campo, cerca de 80% usou como estimativa atributos morfológicos (KINGSOLVER et al., 2001). Destes, parte avaliou atributos de ajuste planta-polinizador, parte avaliou atributos de atratividade, e uma minoria avaliou ambos (BENITEZ-VIEYRA et al., 2014).

A maioria dos estudos de seleção publicados entre 1984 e 1997 não foram replicados e tiveram tamanhos de amostra abaixo de 135 indivíduos (KINGSOLVER et al., 2001). A seleção direcional forte era incomum (média global de gradiente de seleção de 0,16), e a seleção quadrática também era tipicamente bastante fraca (média global de gradiente de seleção de 0,10) (KINGSOLVER et al., 2000). Além disso, a maior parte dos estudos foi realizada em espécies polinizadas por himenópteros ou beija-flores, com poucos estudos avaliando plantas tipicamente esfingófilas (BENITEZ-VIEYRA et al., 2014), aqui abordada.

Há questionamento na literatura quanto a seleção dos atributos florais ser mediada por polinizadores ou por outros fatores. Um estudo questionou se a seleção dos atributos florais era mediada por nutrientes ou por polinizadores, aumentando a disponibilidade de nutrientes e pólen da orquídea *Dactylorhiza lapponica* (Laest. ex Hartm.) Soó (SLETVOLD & AGREN, 2017). Os resultados sugerem que a variação dos recursos naturais não influencia na seleção fenotípica desta espécie, uma vez que houve seleção para mais flores e esporas mais longas, semelhante em todos os tratamentos de nutrientes. Assim, a seleção foi fortemente mediada pelos polinizadores.

De forma controversa, há situações em que foi demonstrado que o polinizador não é o mediador da seleção. No caso de *Cistus ladanifer* L. (Cistaceae), a seleção

fenotípica mediada pelo polinizador nem sempre modula o tamanho e o número da flor no arbusto mediterrâneo, e que ambientes quentes e secos também podem modular a exibição floral (TEIXIDO E VALLADARES, 2014). Pode haver, portanto, seleção estabilizadora ou negativa no tamanho da flor, devido às condições de estresse.

Partindo do princípio de que os polinizadores podem exercer pressão seletiva sobre atributos florais, estudos sobre diferentes fatores que podem levar a uma seleção fenotípica foram realizados. Sletvold et al. (2016) analisaram de que forma os padrões de cores contrastantes atraem ou dirigem polinizadores, e encontraram uma forte seleção destes para aumentar o brilho e o contraste da pétala na orquídea *Anacamptis morio* L. Outro fator investigado foi de que forma a intensidade de polinizadores pode atuar como força de seleção (SLETVOLD et al., 2016). Para isso, foram excluídos polinizadores para intervalos de comprimentos diferentes para induzir cinco níveis de intensidade de polinização dentro de uma única população de plantas. Foi demonstrado que a diminuição da intensidade da polinização aumenta fortemente a seleção em atributos envolvidos na interação.

Em uma outra abordagem, Sletvold et al. (2012) compararam a seleção mediada por polinizadores diurnos e noturnos sobre a exibição floral e o comprimento do esporão na orquídea *Gymnadenia conopsea* (L.) R. Br. Foi constatado que os polinizadores diurnos são mais importantes que os noturnos, pois houve redução da produção de sementes em consequência da exclusão dos polinizadores diurnos, enquanto a retirada dos noturnos não afetou o desenvolvimento.

Os polinizadores diurnos e noturnos também foram comparados quanto à pressão seletiva sobre a fenologia e a morfologia de duas populações de orquídea (CHAPURLAT et al., 2015). Nesse caso, somente os polinizadores noturnos selecionaram as esporas mais longas, tendo uma maior força de seleção. Dessa forma fica explícito que as diferenças na importância relativa dos polinizadores diurnos e noturnos podem causar variação em seleção.

Uma das características florais mais estudadas até então é o comprimento do tubo floral, em busca de compreensão dos mecanismos de ajuste morfológico entre planta e animal. Anderson et. al. (2017) exploraram a evolução do comprimento do tubo floral de *Tritoniopsis revoluta* (Burm. f.) Goldblatt (Iridaceae), buscando compreender de que forma o tubo está associado aos comprimentos de probóscide

dos esfingídeos polinizadores. Encontraram uma forte relação linear positiva entre o comprimento do tubo floral e o comprimento da probóscide do polinizador, mesmo em diferentes populações intimamente relacionadas, sugerindo que as plantas e polinizadores estão finamente ajustados morfologicamente. O fenótipo floral ótimo esteve mais uma vez associado à morfologia dos polinizadores em *Platanthera bifolia* L., uma espécie de orquídea, com variações entre regiões e habitats (BOBERG et al., 2013).

Partindo do mesmo princípio, porém analisando em escalas geográficas muito mais amplas, Johnson et al. (2017) investigaram associações entre comprimento da probóscide do polinizador e do tubo floral, com base de dados para regiões diversas do mundo. Constataram a existência de combinações de comprimento de forma a manter o ajuste morfológico entre animal e planta, apresentando medidas similares de estruturas para cada nicho.

3 Metodologia

3.1 Área de estudo e coleta de dados

O estudo foi desenvolvido em áreas adjacentes ao Horto Botânico Irmão Teodoro Luis (HBITL) (31°46′3″S, 52°26′55″W), uma Área Federal de Preservação Permanente de aproximadamente 25 ha, localizado na Planície Costeira sul do estado do Rio Grande do Sul, Brasil, à 15m acima do nível do mar. A região está situada na fisionomia das Formações Pioneiras com influência da Floresta Estacional Semi-Decidual (VELOSO et al., 1991), com presença de capões de matas de restinga esparsos em um mosaico com banhados e campos, dentro do domínio do Bioma Pampa. O clima local é subtropical úmido (Cfa pela classificação de Köppen-Geiger), com temperatura média anual de 18ºC e pluviosidade média de 1378 mm, distribuída regularmente ao longo do ano (CLIMATE-DA.ORG, 2016).

As coletas de dados ocorreram entre julho de 2015 e janeiro de 2017, contemplando dois picos de floração de *Oenothera ravenii* (Figura 1A), em ecótono entre mata nativa e campo nativo. Teve como unidade amostral o indivíduo da planta, e cada pico de floração foi uma amostra.

3.2 Distribuição temporal da floração

No intuito de verificar o padrão de floração da população, 21 indivíduos de *Oenothera ravenii* tiveram o número de flores quantificado quinzenalmente durante um ano, entre julho de 2015 e junho de 2016. A escolha dos indivíduos e o número amostral foi escolhido de forma a compreender toda a área de estudo de forma bem distribuída. Exsicatas de espécimes em floração foram coletadas e depositadas no Herbário PEL do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pelotas.

3.3 Amostragem, identificação e medição de Sphingidae

Foram realizadas 62 horas de observações focais para a coleta dos esfingídeos visitantes, distribuídas de forma a compreender todo o período de dois eventos de floração da planta em anos distintos, e contemplar horários desde o crepúsculo até o amanhecer. Foram observadas 25:30 horas na primeira floração e 36:30 horas na segunda. Ao registro de cada visita legítima (i.e. com inserção da probóscide no tubo floral) o animal foi coletado com auxílio de rede entomológica.

Para medição das probóscides, os animais coletados foram posicionados sobre uma régua milimétrica e tiveram a probóscide esticada com uma agulha e então mensurada. Os indivíduos foram montados, identificados e depositados na coleção de referência do Laboratório de Ecologia de Lepidoptera, no Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas.

3.4 Medições da área da corola, profundidade do tubo floral e número de flores circundantes

Foram medidas 137 flores de *Oenothera ravenii* de indivíduos distintos, sendo 57 representantes da primeira floração e 80 da segunda, número suficiente para representar a população estudada. As flores foram escolhidas de forma a contemplar toda a área de estudo. Antes da senescência, no início da manhã, cada flor foi fotografada sobre papel milimetrado (Figura 1B, C), e teve a área da corola quantificada em mm², a partir da contagem visual da área da flor sobreposta no papel. A profundidade do tubo floral foi medida com paquímetro, considerando-se desde a abertura até a base da corola (Figura 1D). O número de flores abertas em um raio de 2,5 m ao redor da flor ‘focal’ foi quantificado para consideração nas análises, uma vez que a abundância de flores poderia influenciar na atração dos polinizadores (OHASHI & YAHARA, 2001).

3.5 Medições do número de sementes, porcentagem de germinação e índice de velocidade de germinação

Cada flor medida anteriormente foi marcada e isolada em campo com saco de *voil* (Figura 1E) para evitar a predação/destruição do fruto e a perda de sementes,

uma vez que os frutos são autocóricos. Após o amadurecimento do fruto, as sementes foram coletadas e contadas manualmente em laboratório. Frutos abortados ou sem sementes foram desconsiderados (n=20/137), visto que podem resultar de fatores externos à interação planta-polinizador, como a predação por lagartas ou, em dois casos, dano ao fruto durante a manipulação em campo.

Para os frutos da primeira floração, mediu-se em laboratório a porcentagem de germinação e o índice de velocidade de germinação das sementes, a partir do somatório da quantidade de sementes germinadas a cada dia, dividido pelo número de dias decorridos entre a semeadura e a germinação (O'SHEA & MAGUIRE, 1962). Cada fruto teve três repetições de 25 sementes depositadas sobre papel de germinação em placas de petri com diâmetro de 90 mm (Figura 1F), acondicionadas em câmara de germinação por 21 dias sob temperatura de 20ºC (MAPA, 2009). Nos casos em que o número de sementes disponíveis para o teste de germinação foi menor do que o necessário (n = 75), usou-se a quantidade existente.

3.6 Relação entre os atributos florais e o sucesso reprodutivo

Para investigar a relação da profundidade do tubo floral e a área da corola com a produção de sementes e as medidas de vigor, utilizou-se regressãosimples para cada variável resposta (i.e. número de sementes, porcentagem de germinação e índice de velocidade de germinação), com os termos simples e quadráticos das variáveis preditoras (i.e. área e profundidade) e a interação área*profundidade, de forma a obter os valores de gradientes de seleção direcionais, disruptivos/estabilizadores e correlacionais dos atributos. Para rodar as análises, foram utilizados os pacotes Rcmdr, MCMCglmm, lme4, car, MASS e nlme, no programa R. Após análise exploratória dos dados, realizamos *stepwise simplification* dos modelos excluindo os termos não significativos com base nos valores de AIC. Modelos lineares generalizados, considerando a natureza dos dados com distribuição de Poisson com *log link function*, foram utilizados para estimar a significância dos gradientes de seleção. Também realizamos uma regressão parcial para verificar o efeito de cada variável preditora sobre as variáveis-resposta tendo descontado o efeito da interação entre elas.

Os valores de área da corola foram previamente transformados através de raiz quadrada, devido à diferença dimensional entre área e profundidade. Ambas as

medidas foram padronizadas (i.e. subtraídos os valores de sua média e divididos pelo desvio padrão, através da função *scale* no R). Testes de multicolinearidade das variáveis e de normalidade dos resíduos foram realizados *a priori* para garantir o atendimento às premissas da regressão múltipla. Para avaliar o efeito do número de flores circundantes sobre o sucesso reprodutivo, utilizamos uma Análise de Variância (ANOVA) para comparar modelos com e sem os efeitos randômicos desta variável. O mesmo foi utilizado para identificar variações temporais, utilizando modelos com e sem o efeito randômico do ano da floração. Como não houve diferença significativa entre os modelos (p= 0,99 para abundância de flores; p= 0,45 para ano), ambas variáveis do modelo final foram removidas.

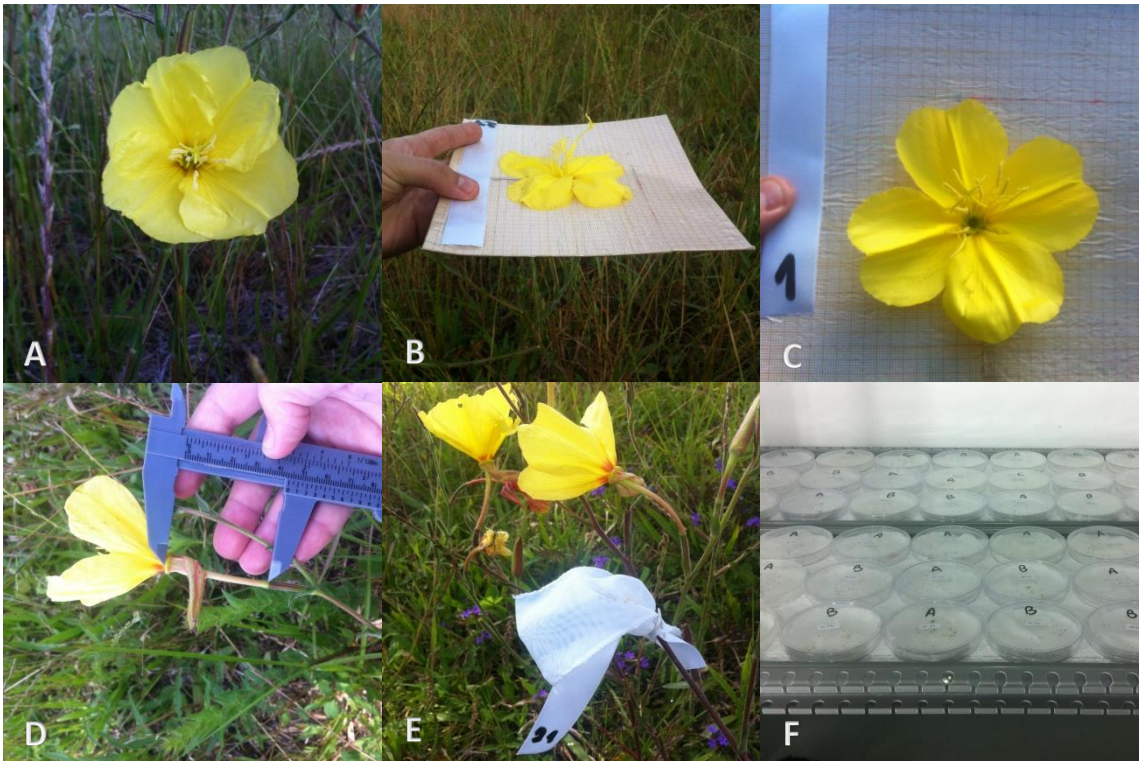

Figura 1 – Ilustração das diferentes etapas do estudo de uma população de *Oenothera ravenii* do município do Capão do Leão, Rio Grande do Sul. A: *Oenothera ravenii*; B e C: Medição da área da corola sobre papel milimetrado; D: Medição do comprimento do tubo floral com paquímetro; E: Isolamento da flor com *voil* e F: Teste de germinação em laboratório.

3 Resultados

A floração de *Oenothera ravenii* ocorreu do início de novembro até o fim de fevereiro, com pico no final de novembro, apresentando um número máximo de cinco flores por indivíduo (Figura 2). Na primeira floração, registraram-se nove visitas por cinco espécies de esfingídeos, com probóscides medindo entre 3,5 e 7 cm (4,84±1,40 cm), enquanto na segunda floração foram registradas 60 visitas por seis espécies de esfingídeos, com probóscides medindo de 3,4 a 9 cm (4,95±1,12 cm) (Tabela 1, Figura 3 e 4).

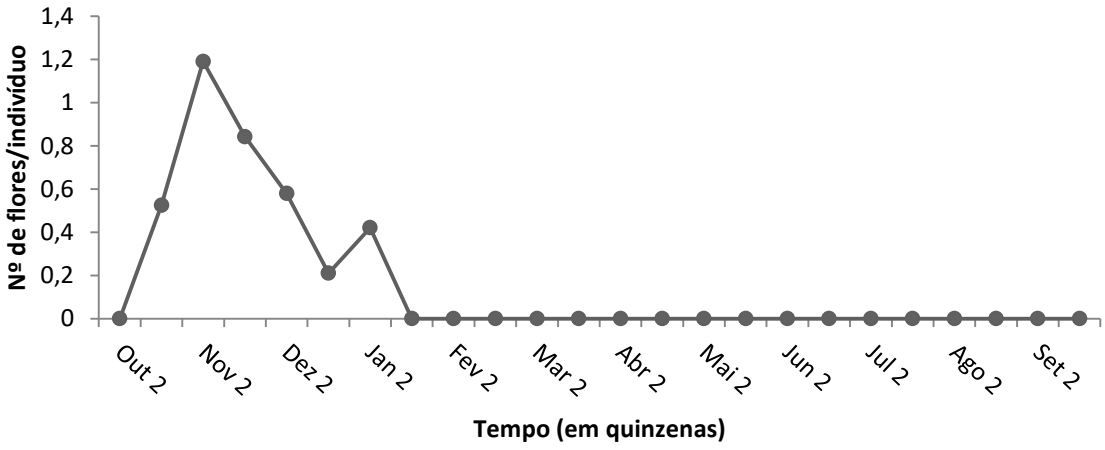

Figura 2 – Distribuição do número de flores por indivíduo de uma população de *Oenothera ravenii* do município do Capão do Leão, Rio Grande do Sul durante o período de Outubro de 2015 até Setembro de 2016, medido em quinzenas.

Tabela 1 – Espécies de esfingídeos registradas como visitantes de uma população de *Oenothera ravenii* do município do Capão do Leão, Rio Grande do Sul coletados entre os anos de 2015 e 2017.com respectivos números de visitas e comprimento de probóscide (média ± desvio padrão).

Visitante floral	**Nº de visitas**	**Compr. da probóscide (cm)**
Agrius cingulata (Fabricius, 1775)	1	10,6
Eumorpha fasciatus (Sulzer, 1776)	7	4,6 ± 0,64
Eumorpha labruscae (Linnaeus, 1758)	1	5,7
Eumorpha triangulum (Rothschild & Jordan, 1903)	1	5,7
Eumorpha vitis (Linnaeus, 1758)	25	4,4 ± 0,39
Manduca contracta (Butler, 1875)	12	5,9 ± 1,14
Manduca diffisa (Butler 1871)	2	7,0 ± 0,50
Manduca florestan (Stoll 1782)	16	5,4 ± 1,22
Xylophanes tersa (Linnaeus, 1771)	4	3,4 ± 1,39

A população estudada caracterizou-se por uma ampla variação dos fenótipos medidos. A área da corola foi de 15 à 88,2 cm² (56,8±14,5). A profundidade do tubo floral foi de 3,1 à 6,2 cm (4,8±0,5) (Figura 4). As flores ‘focais’ tiveram entre zero e 33 flores circundantes.

Para as medidas de sucesso reprodutivo, o número de sementes foi de 7 à 476 (273±123). A porcentagem de germinação foi de zero à 92% (51,5±26,1). O índice de velocidade de germinação foi de zero à 2,9 (1,1±0,7).

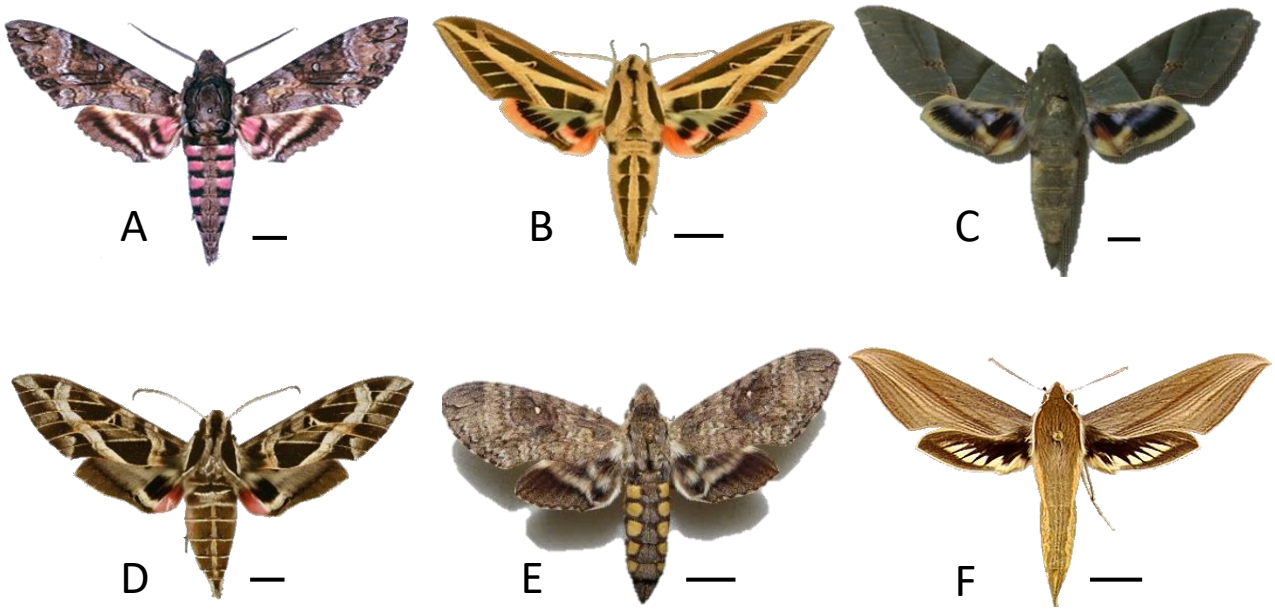

Figura 3 – Prancha dos esfingídeos visitantes de uma população de *Oenothera ravenii* do município do Capão do Leão, Rio Grande do Sul, coletados entre os anos de 2015 e 2017. A= *Agrius cingulata* (Fabricius, 1775); B= *Eumorpha fasciatus* (Sulzer, 1776); C= *Eumorpha labruscae* (Linnaeus, 1758); D= *Eumorpha triangulum* (Rothschild & Jordan, 1903); E= *Manduca diffisa* (Butler 1871); F= *Xylophanes tersa* (Linnaeus, 1771); linha=1cm.

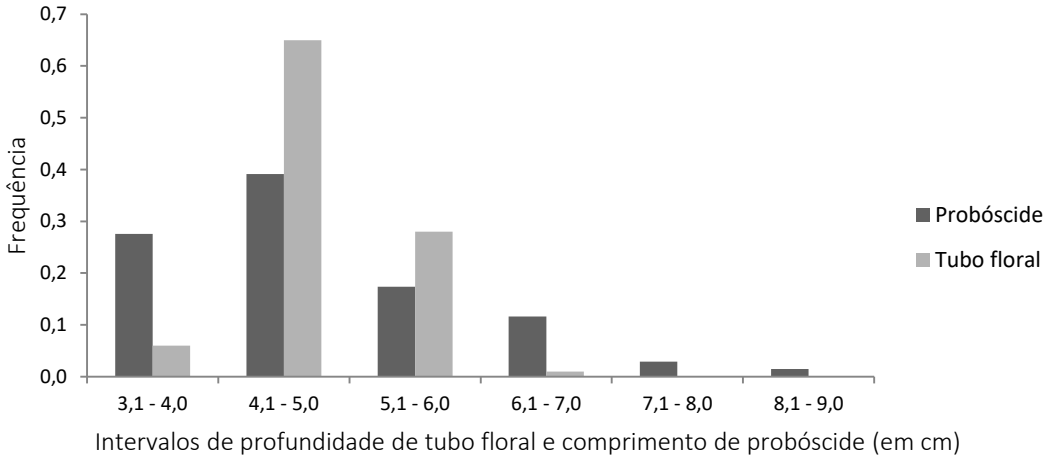

Figura 4 – Distribuição das frequências de profundidade de tubo floral de uma população de *Oenothera ravenii* do município do Capão do Leão, Rio Grande do Sul e do comprimento de probóscides dos esfingídeos visitantes coletados entre os anos de 2015 e 2017.

O modelo linear final explicou 18,3% da variação do número de sementes (R^2= 0,18) e incluiu os termos de profundidade, área e a interação profundidade*área. Para a área da corola, encontramos um gradiente de seleção

direcional positivo de βi= 56,60 (p<0,001), indicando maior aptidão para flores com áreas de corola maiores (Figura 5).

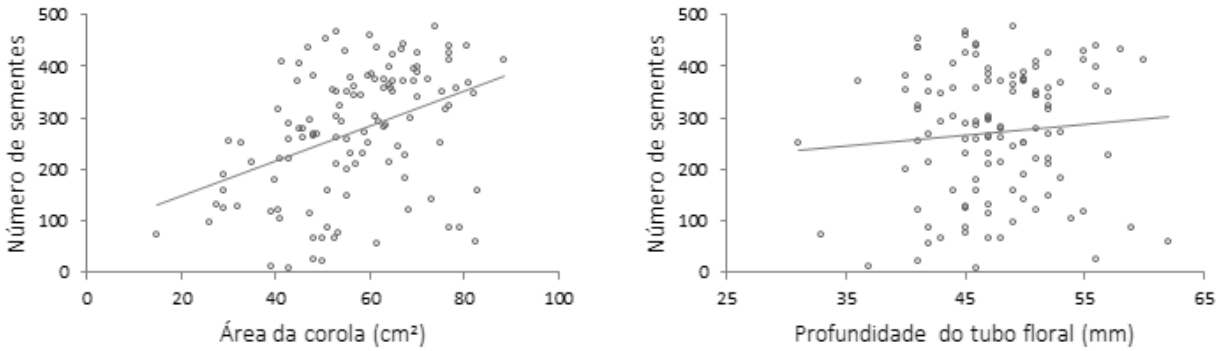

Figura 5 – Regressões do número de sementes formadas em relação à área da corola e à profundidade do tubo floral para uma população de *Oenothera ravenii* do município do Capão do Leão, Rio Grande do Sul, observada em duas florações nos anos de 2015 à 2017.

Quando o conjunto de dados foi analisado separadamente entre anos, a primeira floração apresentou além do gradiente de seleção direcional positivo sobre a área (βi=72,80, p<0,001), um gradiente de seleção estabilizadora sobre a profundidade do tubo floral (γii=-45,37, p<0,001) (Figura 6) e gradiente de seleção correlacional entre área a profundidade (γij= 47,66, p<0,001), explicando 61% da variação do número de sementes (R^2=0,61) (Figura 7). Já a segunda floração apresentou um gradiente de seleção direcional postivo sobre a área (βi= 11,6, p= 0,00779), explicando 19,7% da variação do número de sementes (R^2= 0,20) (Figura 8).

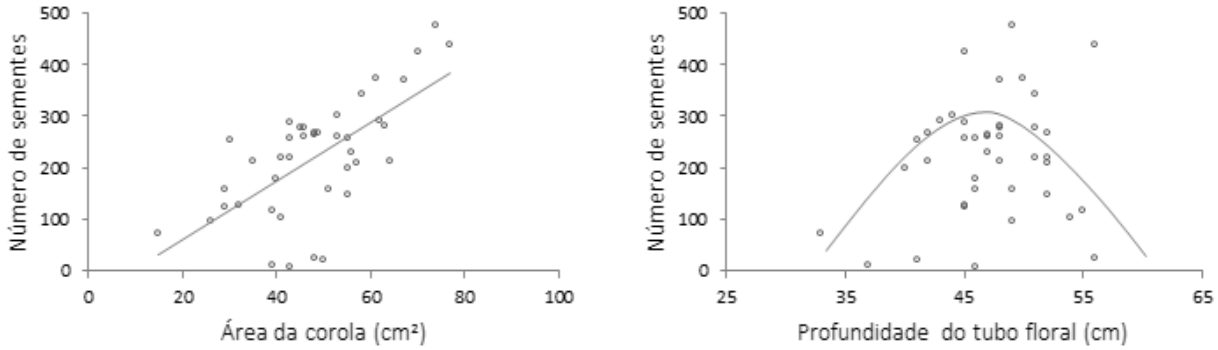

Figura 6 – Regressões do número de sementes formadas em relação à área da corola e à profundidade do tubo floral para uma população de *Oenothera ravenii* do município do Capão do Leão, Rio Grande do Sul, observada em uma floração em 2015-2016.

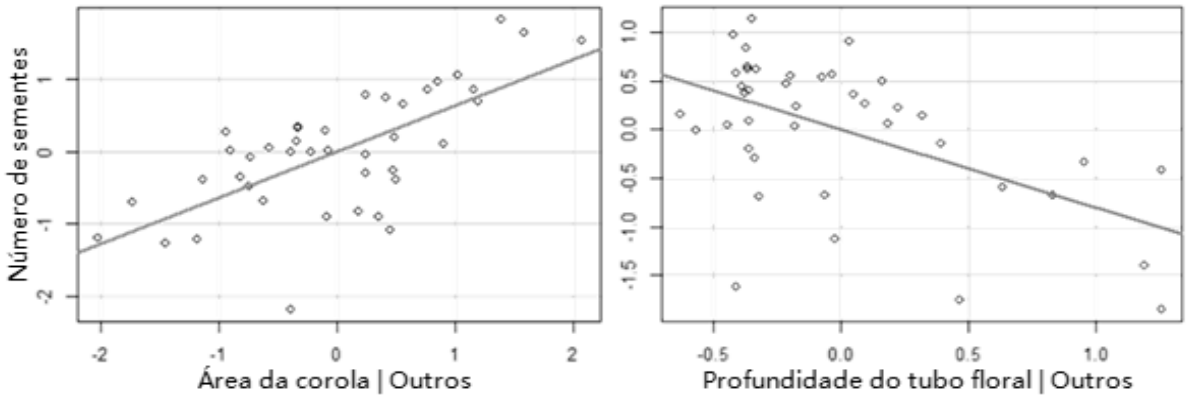

Figura 7 – Regressão parcial do número de sementes formadas em relação à área da corola e à profundidade do tubo floral para uma população de *Oenothera ravenii* do município do Capão do Leão, Rio Grande do Sul, observada em uma floração em 2015-2016.

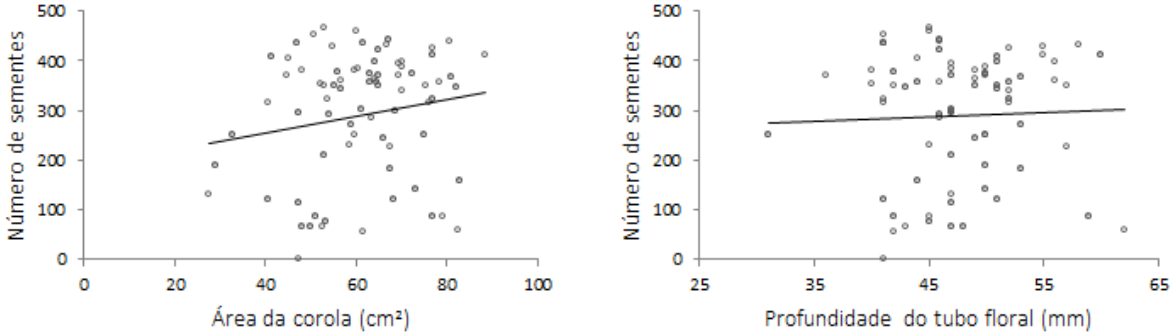

Figura 8 – Regressões do número de sementes formadas em relação à área da corola e à profundidade do tubo floral para uma população de *Oenothera ravenii* do município do Capão do Leão, Rio Grande do Sul, observada em uma floração em 2016-2017.

As medidas de vigor, i.e. porcentagem de germinação e índice de velocidade de germinação não apresentaram correlação significativa com a área da corola e a profundidade do tubo floral (Tabela 2).

Tabela 2 – Coeficientes de seleção e valores de significância obtidos através da regressão múltipla da porcentagem de germinação e do índice de velocidade de germinação, com as medidas de área da corola e comprimento do tudo floral para uma população de *Oenothera ravenii* do município do Capão do Leão, Rio Grande do Sul. βi = gradientes de seleção linear, Yii = gradientes de seleção quadrática, Yij = gradientes de seleção correlacional.

Porcentagem de germinação						
Atributos	β*i*	p	Y*ii*	p	Y*ij*	p
Profundidade	0,07026	0,119	0,01896	0,634	-0,01795	0,737
Área	-0,03142	0,483	0,03493	0,416	-	-
Índice de velocidade de germinação						
Atributos	β*i*	p	Y*ii*	p	Y*ij*	p
Profundidade	0,14085	0,239	0,03647	0,732	0,01074	0,940
Área	-0,08337	0,487	0,00075	0,995	-	-

4 Discussão

Conforme predito, flores de *Oenothera ravenii* com áreas da corola maiores apresentaram maior sucesso reprodutivo, indicando que a seleção fenotípica favorece flores cada vez mais vistosas. Constatamos principalmente que essa característica exerce forte influência para a seleção mediada por esfingídeos, demonstrado a partir dos valores de gradiente de seleção direcional positivo em ambas as florações amostradas, e não apenas a profundidade do tubo floral, como se tem predominantemente enfocado até o momento (e.g. DARWIN, 1862; WASSERTHAL, 1997; SAZATORNIL et al., 2016). Uma explicação para este padrão pode ser que áreas maiores de corola são mais facilmente localizadas pelo polinizador sendo, portanto, mais visitadas e gerando a maior formação de sementes. Assim, as flores grandes têm vantagens quanto à polinização, possibilitando maior transferência de pólen. Porém, o gasto energético com área floral limita a função feminina, gerando um conflito entre os benefícios da função masculina e os custos da feminina (TEIXIDO & VALLADARES, 2014). No caso da *Oenothera ravenii*, este pode ser contornado pela curta durabilidade da flor, de apenas uma noite.

Uma maior importância da área no processo de seleção foi revelada durante a primeira floração, quando detectamos influência da área da corola sobre a seleção do comprimento do tubo floral. Interessantemente, nessa situação houve uma seleção estabilizadora fraca na profundidade do tubo floral e seleção direcional positiva na área. Dessa forma, as flores maiores e com tubos florais de profundidade intermediária foram selecionadas, apresentando maior sucesso reprodutivo. Porém, ao observar as variáveis separadamente, a profundidade da corola isolada se comportou de forma diferente, apresentando relação linear negativa com o número de sementes (Figura 7). Isso indica que, no que se refere somente à profundidade,

flores mais curtas são favorecidas. Ainda assim, flores com tubos longos e áreas amplas também tiveram alto sucesso reprodutivo, determinando que uma vez que a flor é encontrada pelo polinizador, associado mais fortemente ao tamanho da área, o comprimento do tubo floral pouco contribui para isto. Desta forma, este estudo é o primeiro a apresentar maior importância relativa para determinado atributo no processo seletivo, exercendo efeito sobre a seleção de outro. Estes resultados evidenciam a importância da atratividade visual como suporte à ideia de que esfingídeos são primeiramente atraídos por corolas com áreas maiores, seguidas pelo odor do néctar disponível na planta e do ajuste morfológico da profundidade do tubo floral à extensão da sua probóscide (RAGUSO & WILLIS, 2003).

A extensão da probóscide dos polinizadores é um dos componentes associados aos padrões de evolução em atributos como a profundidade do tubo floral (JOHNSON et al., 2017) e frequentemente desempenha papel fundamental na síndrome de esfingofilia (SAZATORNIL et al., 2016). Neste estudo, detectamos a existência de ajuste entre a distribuição de frequências de profundidades de tubo floral de *Oenothera ravenii* e os comprimentos de probóscide da fauna de esfingídeos na comunidade estudada (Figura 4). Ao observarmos a amplitude de tamanhos de probóscides dos animais, os valores distribuem-se cobrindo desde as flores mais curtas até as mais profundas. Ainda, o maior número de visitas foi dado por esfingídeos com corolas intermediárias, sendo *Eumorpha vitis* (4,4 cm) e *Manduca florestan* (5,4 cm) responsáveis por 60% das frequências de visitação. É possível, portanto, que a baixa força seletiva desse caractere seja resultado de regimes de seleção semelhantes em gerações passadas, ocasionando o ajuste morfológico atual, uma vez que somente tubos desajustados ao comprimento de probóscide deveriam ser desfavorecidos (SAZATORNIL et al., 2016).

A influência da intensidade de polinização é pouco explorada na literatura, e os poucos estudos existentes apontam que a diferença de intensidade afeta a força de seleção fenotípica (VANHOENACKER et al., 2012). Uma possível explicação para que a profundidade dos tubos florais não tenha demonstrado forte efeito na população estudada seria de que a variação interanual da abundância de esfingídeos polinizadores pode ter influenciado o processo de seleção fenotípica, como já demonstrado experimentalmente em outros estudos, a diminuição da intensidade da polinização aumenta fortemente a seleção em atributos envolvidos na interação (e.g. SLETVOLD & ÅGREN, 2016). Devido a um cenário de mudança de

fraca para forte competição, os esfingídeos enfrentaram maior concorrência pelo alimento na segunda floração de *Oenothera*. Com mais de um esfingídeo visitante por hora de observação na segunda floração, enquanto apenas uma captura a cada três horas na primeira, é possível ter havido menor força seletiva para a população da planta, visto que a abundância das flores se manteve semelhante ao longo das duas florações

Uma vez que somente a formação de sementes foi associada com a área e profundidade das flores, sugere-se que o tamanho da prole – mas não o vigor dos indivíduos – seja dependente do fenótipo floral. Isto se dá provavelmente porque a quantidade de óvulos produzidos pela espécie é elevada, de modo que a quantidade – e não a qualidade – de pólen é determinante para o número de sementes formadas. Quando associado ao resultado de maior sucesso de flores maiores, sugere-se que a quantidade de pólen recebida é provavelmente dependente do tamanho das flores. Sustentamos dessa forma a hipótese de que em situações de limitação de pólen, a seleção favorece as flores de maior atratividade visual (ASHMAN & MORGAN, 2004).

5 Conclusão

Apresentou-se evidências de que existe seleção fenotípica mediada por polinizadores favorecendo flores de *Oenothera ravenii* com área de corola cada vez maior na população estudada. Principalmente, constatou-se que o tamanho da corola foi o fator estruturador dessa interação, sofrendo forte pressão seletiva pelas mariposas, e sobrepondo-se à seleção do comprimento de tubo floral. Desta forma, este trabalho teve o resultado inédito de um atributo exercer efeito no processo seletivo de outro. Como a co-evolução é um processo dinâmico no tempo e no espaço (THOMPSON, 2005), outros fatores tal como a abundância de polinizadores merece atenção de futuros estudos, já que pode influenciar a força da seleção mediada por polinizadores e dirigir os regimes de seleção (SLETVOLD & ÅGREN, 2016).

Referências

ANDERSON, B. et al. Intraspecific divergence and convergence of floral tube length in specialized pollination interactions. **Proc. R. Soc. B.**, n. 281, 2014.

ASHMAN, T.-L.; MORGAN, M. T. Explaining phenotypic selection on plant attractive characters: male function, gender balance or ecological context? **The Royal Society**, n. 271, p. 553-559, 2004.

BENITEZ-VIEYRA, Santiago et al. Seleção fenotípica mediada por polinizadores. In: RECH, A. R.; AGOSTINI, K.; OLIVEIRA, P. E.; MACHADO, I.C. (Org.). **Biologia da Polinização**. Rio de Janeiro: Projeto Cultural, 2014. p. 349-371

BENITEZ-VIEYRA, S.; MEDINA, A. M.; COCUCC, A. A. Variable selection patterns on the labellum shape of *Geoblasta pennicillata*, a sexually deceptive orchid. **Evol. Biol.**, n. 22, p. 2354-2362, 2009.

BENITEZ-VIEYRA, S.; MEDINA, A. M.; GLINOS, E.; COCUCC, A. A. Pollinator-mediated selection on floral traits and size of floral display in *Cyclopogon elatus*, a sweat bee-pollinated orchid. **Functional Ecology**, n. 20, p. 948-957, 2006.

BOBERG, E. et al. Pollinator shifts and the evolution of spur length in the moth-pollinated orchid *Platanthera bifolia*. **Annals of Botany**, n. 113, p. 267-275, 2014

BRODIE III, E. D.; MOORE, A. J.; JANZEN, F. J. Visualizing and quantifying natural selection. **TREE**, n. 8, p. 313-318, 1995.

CAVALHEIRO, Lis Bacchieri Duarte; LAUTENSCHLEGER, Andreza de Ávila; BOBROWSKI, Vera Lúcia; BONNET, Olivier Jean François; VIZENTIN-BUGONI, Jeferson; ISERHARD, Cristiano Agra. Seleção Fenotípica Mediada por Esfingídeos (Lepidoptera) em Atributos Florais de *Oenothera Ravenii* W. Dietr. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 26., 2016, Anais... Rio Grande do Sul: Pelotas, 2016

CHAPURLAT, E. et al. Spatial variation in pollinator-mediated selection on phenology, floral display and spur length in the orchid *Gymnadenia conopsea*. **New Phytologist**, n. 208, p. 1264-1275, 2015.

CLIMATE-DA.ORG Disponível em: <http://pt.climate-data.org/location/43789/> Acesso em: 20/10/2016.

DARWIN, Charles Robert. 1862. **On the various contrivances by which British and foreign orchids are fertilised by insects, and on the good effects of intercrossing.** London: John Murray. 1862. 336 p.

FAEGRI, Knut; VAN DER PIJL, Leendert. **The principles of pollination ecology**. Oxford: Pergamon Press. 1971. 291 p.

FENSTER, C. B.; ARMBRUSTER, W. S.; WILSON, P.; DUDASH, M. R.; THOMSON, J. D. Pollination Syndromes and Floral Specialization. **Annu. Rev. Ecol. Evol**. **Syst.,** n. 35, p. 375-403, 2004.

GÓMEZ, J. M. Phenotypic selection and response to selection in *Lobularia maritima*: importance of direct and correlational components of natural selection. **J . Evol. Biol**., n. 13, p. 689-699, 2000.

GRIGOLETTO, D. et al. O gênero *Oenothera* L. (Onagraceae) no município de Santa Maria, Rio grande do sul, brasil. **Balduinia**, n. 24, p. 13-23, 2010.

JOHNSON, S. D.; MORÉ, M.; AMORIM, F.W.; HABER, W.A.; FRANKIE, G.W.; STANLEY, D.A.; COCCUCI, A.A.; RAGUSO, R.A. The long and the short of it: a global analysis of hawkmoth pollination niches and interaction networks. **Functional Ecology**, n. 31, p. 101-115, 2017.

JOHNSON, S.D.; STEINER, K.E. Generalization versus specialization in plant pollination systems. **Trends in Ecology and Evolution,** n. 15, p. 140-143, 2000

KINGSOLVER, J. G. et al.The Strength of Phenotypic Selection in Natural Populations. **The American Society of Naturalists**, n. 3, p. 244-261, 2001

LAMIM-GUEDES, Valdir**. Especialização em sistemas planta-polinizador: características florais e oferta de recursos alimentares**. 2011. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Programa de Pós-graduação em Ecologia de Biomas Tropicais, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2011

LANDE, R.; ARNOLD, S. J. The measurement of selection on correlated characters. **Evolution**, n. 6, p.1210-1226, 1983.

MAPA. 2009 Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Brasil. Regras para análise de sementes. Brasília: Mapa/ACS, 2009. 399 p.

O'SHEA, J.; MAGUIRE, M. F. Determination of calorific value of feedstuffs' by chromic acid oxidation**. J. Sci. Food Agric**, n. 13, p. 530-534, 1962.

OHASHI, K.;YAHARA, T. Behavioural responses of pollinators to variation in floral display size and their influences on the evolution of floral traits. In CHITTKA, Lars & THOMSON, James D. **Cognitive ecology of pollination**. Cambridge Univ. Press, Cambridge, 2001. p. 274-296.

OLIVEIRA, Reisla et al. Polinização por lepidopteros. In: RECH, A. R.; AGOSTINI, K.; OLIVEIRA, P. E.; MACHADO, I.C. (Org.). **Biologia da Polinização**. Rio de Janeiro: Projeto Cultural, 2014. p. 235-257

OLLERTON, J.; DIAZ, A. Evidence for stabilising selection acting on fowering time in *Arum maculatum* (Araceae): the infuence of phylogeny on adaptation. **Oecologia**, n.119, p. 340-348, 1999.

OLLERTON, J.; WINFREE, R.; TARRANT, S. How many flowering plants are pollinated by animals? **Oikos**, n.120, p. 321-326, 2011.

R Development Core Team. 2014 R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. http://www.R-project.org

RAGUSO, Robert A.; WILLIS, Mark A. Hawkmoth pollination in Arizona's Sonoran Desert: Behavioral Responses to Floral Traits. In: Boggs, C. L.; Watt, W. B.; Ehrlich, P.R. **Butterflies: Ecology and Evolution Taken Flight**. Chicago e Londres: The university of Chicago Press, 2003. p. 43-65.

RHODES, M. K.; FANT, J. B.; SKOGEN, K. A. Pollinator identity and spatial isolation influence multiple paternity in an annual plant. **Mol Ecol.**, n. 16, p. 4296-4308, 2017.

SAZATORNIL, F. D.; MORÉ, M.; BENITEZ-VIEYRA, S.; COCUCCI, A. A.; KITCHING, I. J.; SCHLUMPBERGER, B. O.; OLIVEIRA, P.E.; SAZIMA, M.; AMORIM, F. W. Beyond neutral and forbidden links: morphological matches and the assembly of mutualistic hawkmoth–plant networks**. Journal of Animal Ecology**, n. 6, p.1586-1594, 2016.

SLETVOLD, N.; ÅGREN, J. There is more to pollinator-mediated selection than pollen limitation. **Evolution**, n. 68, p. 1907-1918, 2014.

SLETVOLD, N.; ÅGREN, J. Experimental reduction in interaction intensity strongly affects biotic selection. **Ecology**, n.11, p. 3091-3098, 2016.

SLETVOLD, N.; ÅGREN, J. Resource- and pollinator-mediated selection on floral Traits. **Functional Ecology**, n. 31, p.135-141, 2017.

SLETVOLD, N. et al. Separating selection by diurnal and nocturnal pollinators on floral display and spur length in *Gjmnadenia conopsea*. **Ecology**, n. 8, p. 1880-1891, 2012.

SLETVOLD, N. et al. Strong pollinator-mediated selection for increased flower brightness and contrast in a deceptive orchid. **Evolution**, n. 70, p. 716–724, 2016

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2008, 293 p.

TEIXIDO, A. L.; VALLADARES, F. Pollinator-mediated phenotypic selection does not always modulate flower size and number in the large-flowered Mediterranean shrub *Cistus ladanifer* (Cistaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, n. 176, p. 540–555, 2014.

THOMPSON, John N. **The Geographic Mosaic of Coevolution**. Chicago: The University of Chicago Press, 2005, 400 p.

VANHOENACKER, D.; ÅGREN, J.; EHRLÉN, J. Non-linear relationship between intensity of plant–animal interactions and selection strength.**Ecology Letters**, n. 16, p. 198–205, 2012.

VELOSO, H. P.; RANGEL-FILHO, A. L. R.; LIMA, J. C. A. Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal. **IBGE**, Departamento de Recursos Naturais e Estudos Ambientais, Rio de Janeiro, 1991.

WAGNER, W.L.; HOCH, P.C.; RAVEN, P.H. Revised classification of the Onagraceae. **Systematic Botany Monographs**, n. 83, p. 1-240, 2007

WASSERTHAL, L. T. The pollinators of Malagasy star *orchids Angraecum sesquipedale*, *A. sororium* and *A. compactum* and the evolution of extremely long spurs by pollinator shift. **Botanica Acta,** n. 110, p. 343-359, 1997.