

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Instituto de Biologia
Curso de Ciências Biológicas - Bacharelado



Trabalho de Conclusão de Curso

**Análise e identificação de grãos de pólen coletados em mariposas
(Lepidoptera: Sphingidae) para aplicação em interações planta-polinizador**

Juliana de Souza Chagas

Pelotas, 2018

Juliana de Souza Chagas

**Análise e identificação de grãos de pólen coletados em mariposas
(Lepidoptera: Sphingidae) para aplicação em interações planta-polinizador**

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

Orientador: Prof. Dr. Cristiano Agra Iserhard

Co-orientador: Dr. Jeferson Vizentin-Bugoni

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

C426a Chagas, Juliana de Souza

Análise e identificação de grãos de pólen coletados em mariposas (Lepidoptera: Sphingidae) para aplicação em interações planta-polinizador / Juliana de Souza Chagas, Andreza Lautenschleger ; Cristiano Agra Iserhard, orientador ; Jeferson Vizentin-Bugoni, coorientador. — Pelotas, 2018.

37 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) — Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Acetólise. 2. Comunidades. 3. Interações planta-polinizador. 4. Palinoteca. 5. Polinização. I. Lautenschleger, Andreza. II. Iserhard, Cristiano Agra, orient. III. Vizentin-Bugoni, Jeferson, coorient. IV. Título.

CDD : 595.78

Resumo

CHAGAS, Juliana de Souza. **Análise e identificação de grãos de pólen coletados em mariposas (Lepidoptera: Sphingidae) para aplicação em interações planta-polinizador.** 2018. 37f. Trabalho de Conclusão de Curso. Curso de Ciências Biológicas – Bacharelado, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

A maioria dos estudos que descrevem redes de interações polinizador-planta é baseada em observações focais (amostragem fitocêntrica). A análise e identificação dos grãos de pólen depositados no corpo dos polinizadores (amostragem zoocêntrica) podem, porém, contribuir para a identificação de interações planta-polinizador e a descrição destas redes. As plantas polinizadas pelas mariposas da família Sphingidae possuem características específicas, tais como antese floral noturna, coloração branca ou clara, corola profunda e forte odor, constituindo a síndrome de esfingofilia. Desta forma este estudo teve como objetivo identificar grãos de pólen encontrados em esfingídeos, visando complementar uma rede de interações planta–esfingídeo previamente montada a partir de observações focais. O estudo foi realizado no Horto Botânico Irmão Teodoro Luís e na estrada e entorno no Campus Capão do Leão da Universidade Federal de Pelotas. Neste trabalho foram montadas 77 lâminas com os grãos de pólen retirados da probóscide e corpo das mariposas, e das flores esfingófilas observadas em campo. Foram analisadas 43 lâminas de grãos de pólen das mariposas coletadas, resultando em 10 morfotipos de pólen não observados na amostragem fitocêntrica. Além destes, também foram encontrados grãos de pólen de quatro espécies de flores esfingófilas observadas na amostragem fitocêntrica, sendo que a espécie *Brugmansia suaveolens* não obteve visitação de esfingídeos. Por outro lado, *Ipomoea alba* que interagiu com esfingídeos durante a amostragem fitocêntrica, não teve interações detectadas usando a amostragem zoocêntrica. Pólen foi detectado em sete espécies de esfingídeos das 17 coletadas. Dos 236 indivíduos coletados, 40% são da espécie *Aellopos tantalus*, contudo apenas um indivíduo apresentou grãos de pólen aderidos ao corpo. Os resultados demonstraram que amostragem zoocêntrica é útil não apenas para confirmar interações com espécies esfingófilas detectadas via amostragem fitocêntrica, mas também para detectar interações adicionais não observadas por amostragem fitocêntrica o que leva, portanto, à complementação da rede de interações.

Palavras-chave: acetólise; comunidades; interações planta-polinizador; palinoteca; polinização; Rio Grande do Sul; esfingofilia

Abstract

CHAGAS, Juliana de Souza. **Analysis and identification of pollen grains collected in moths (Lepidoptera: Sphingidae) for interaction plant-pollinator application.** 2018. 37p. Bachelor thesis, Instituto de Biologia - Graduação em Ciências Biológicas – Bacharelado, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

Most studies describing pollinator-plant interaction networks are based on focal observations (phytcentric sampling). The analysis and identification of pollen grains deposited in the body of pollinators (zootocentric sampling) may, however, contribute to the identification of plant-pollinator interactions and the description of interaction networks. Plants pollinated by the hawkmoths (Sphingidae) have specific characteristics, such as nocturnal floral anthesis, white or light coloration, long corolla, and strong odor, matching the so called sphingophily syndrome. This study aimed to identify pollen grains found in hawkmoths, aiming to complement a plant-hawkmoths interaction network previously assembled from focal observations. Data collection was carried out at the Horto Botânico Irmão Teodoro Luís and on the road and surroundings of the Capão do Leão Campus of the Federal University of Pelotas. In this work, 77 slides were assembled with the pollen grains removed from proboscis and body of the moths, and from the sphingophilous flowers observed in the field. A total of 43 pollen grains of the collected moths were analyzed, resulting in 10 pollen morphotypes not observed in the phytocentric sampling. In addition, pollen grains of four species of sphingophilous plants observed in the phytocentric sampling were found in hawkmoths bodies. We also found pollen of *Brugmansia suaveolens*, which was observed but had no visitation by hawkmoths recorded. On the other hand, *Ipomoea alba* that interacted with hawkmoths during phytocentric sampling, had no interactions detected using zoocentric sampling. Seven out of 17 hawkmoth species had pollen in their bodies. Of the 236 individuals collected, 40% were *Aellopos tantalus*, yet only one individual had pollen grains adhered to the body. Our results show that zoocentric sampling is not only useful to confirm interactions with sphingophilous species detected through phytocentric sampling, but also to detecting additional interactions not observed by phytocentric sampling, which leads, therefore, to a more complete description of the plant-hawkmoth network.

Key-words: acetolysis; communities; palinoteca; plant-pollinator interactions; pollination; Rio Grande do Sul; sphingophily

Lista de Figuras

- Figura 1 Imagens realizadas através do Google Earth. (A) Horto Botânico Irmão Teodoro Luís. (B) Estrada e entorno do Campus Capão do Leão..... 18
- Figura 2 Processo de coleta dos grãos de pólen aderidos ao corpo e probóscide das mariposas coletadas, para a confecção de lâminas..... 20
- Figura 3 (A) Foto de *Eumorpha fasciatus* (Sulzer, 1776) com grãos de *Oenothera ravenii* W. Dietr. presos em sua probóscide. Lupa estereoscópica.
(B) Grão de *Oenothera ravenii* W. Dietr. ao lado de outro grão de pólen. Microscópio óptico (400x)..... 27
- Figura 4 (A) Grãos de pólen de *Brugmansia suaveolens* (Wild) Sweet. Microscópio óptico (400x). (B) Grãos de pólen de *Oenothera ravenii* W. Dietr. Microscópio eletrônico (100x)..... 27
- Figura 5 (A) Flor de *Oenothera ravenii* W. Dietr. (B) Flor de *Nicotiana alata* Link & Otto. (C) Grãos de pólen de *Nicotiana alata* Link & Otto. Microscópio eletrônico (400x)..... 29
- Figura 6 (A) Antera de *Inga* sp.1. Microscópio eletrônico (100x). (B) Agrupamento do tipo Polyad de grãos de pólen de *Inga* sp.1. Microscópio eletrônico (400x)..... 29
- Figura 7 Espécies de Sphingidae que ocorreram na rede zoocêntrica. (A) *Aellopos tantalus* (Linnaeus, 1758) (B) *Agrius cingulata* (Fabricius, 1775) (C) *Eumorpha fasciatus* (Sulzer, 1776) (D) *Eumorpha vitis* (Linnaeus, 1758) (E) *Manduca contracta* (Butler, 1875) (F) *Manduca florestan* (Stoll, 1782) (G) *Xylophanes tersa* (Linnaeus, 1771)..... 31

Figura 8 Morfotipos de grãos de pólen que ocorreram na rede zoocêntrica.

(A) Celastraceae (B) Amaranthaceae (C) Acanthaceae (D)

Loranthaceae (E) Amaryllidaceae (F) Alismataceae (G)

Melastomataceae (H) Apocynaceae (I) Asteraceae (J)

Primulaceae..... 32

Lista de Tabelas

Tabela 1	Protocolo Aclac de acetólise para a análise de grãos de pólen das mariposas que foram coletadas no município do Capão do Leão, Rio Grande do Sul, entre novembro de 2015 e abril de 2017.....	20
Tabela 2	Lista de espécies de Sphingidae coletadas de indivíduos com grãos de pólen encontrados no município do Capão do Leão, Rio Grande do Sul, entre novembro de 2015 e setembro de 2018.....	23
Tabela 3	Matriz zoocêntrica de interações indicando quais morfotipos de pólen foram encontrados nas distintas espécies de mariposas.....	24
Tabela 4	Lista de espécies de Sphingidae e das flores visitadas em redes fitocêntrica e zoocêntrica analisadas e coletadas no município do Capão do Leão, Rio Grande do Sul entre novembro de 2015 e setembro de 2018.....	25

Sumário

1. Introdução	12
1.1 Objetivos	16
1.1.1 Objetivo Geral	16
1.1.2 Objetivos Específicos	16
1.2 Hipóteses	17
2. Material e Métodos	18
2.1 Área de estudo	18
2.2 Amostragem	19
2.3 Análise de dados	21
3. Resultados e Discussão	22
4. Conclusão	34
Referências	35

Juliana de Souza Chagas

**Análise e identificação de grãos de pólen coletados em mariposas
(Lepidoptera: Sphingidae) e sua aplicação na descrição de redes de interações
planta-polinizador**

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

Data da Defesa: 28 de Novembro de 2018

Banca examinadora:

.....
Prof. Dr. Cristiano Agra Iserhard (Orientador)

Doutor em Biologia Animal pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

.....
Prof.(a) Dr.(a) Raquel Lüdtké

Doutora em Botânica pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

.....
Prof. Dr. Sebastian Felipe Sendoya Echeverry

Doutor em Ecologia pela Universidade Estadual de Campinas

.....
Prof. Dr. Rafael Antunes Dias (Suplente)

Doutor em Ecologia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Agradecimentos

Parece que nunca chegaremos aqui, na parte de agradecer. Produzir um TCC é tão exaustivo que a sensação que temos é que nunca chegaremos ao fim dele, e quando chegamos na parte de colocar o título mais importante do trabalho, ficamos lembrando tudo que passamos para chegarmos exatamente aqui, nos Agradecimentos. Mas apesar do quão exaustivo um TCC possa ser, só consigo pensar nos momentos felizes que eu tive até chegar aqui, incluindo as noites mal dormidas. Eu me lembro do quão excitante foi quando eu decidi que queria trabalhar com mariposas, e acredite, eu nunca achei que fosse acabar no mundo microscópico dos grãos de pólen, mas aqui estou agradecendo por esse trabalho que já muito me deixou louca, mas que muito me fez feliz também. Sim, meu primeiro agradecimento vai pra esse trabalho, pode até parecer um tanto peculiar, mas o que não é peculiar na Biologia não é mesmo?!

Esse trabalho me proporcionou inúmeras aventuras, como participar de campos noturnos observados por olhinhos brilhantes e curiosos, campos diurnos com direito a aquela fugidinha dos gigantescos búfalos, o temor ao “brincar” de químico maluco misturando todos os ácidos da acetólise, ao prazer de colher flores do campo, das tantas visitas de mariposas, borboletas, aranhas, morcegos, graxains, lontras, cachorros, cobras e porque não também de humanos curiosos. Neste trabalho eu tive a oportunidade de ser de tudo um pouquinho, da zoóloga a botânica, da ecóloga a química, e até a uma entomologista metida no museu, que de vez em quando ajudava o pessoal da Agronomia a identificar um inseto aqui que lá. Então meu muito obrigado aos esfingídeos, aos grãos de pólen, ao LELEP, a Andrezinha minha parceira, e aos meus queridos e muito atenciosos orientadores Cris e Jefinho, sem vocês me guiando eu nunca chegaria até aqui.

Agradecer aos meus familiares, que sempre estiveram na torcida, em especial aos meus pais. Mãe se hoje estou aqui é porque tu ficaste noites em claro comigo, me acalmando quando eu achei que nada ia dar certo, assistindo milhões de vezes aquelas apresentações que sempre me deixavam em pânico, tu foste quem segurou minha mão e me prendeu num abraço em todos esses anos. Pai, se hoje eu estou me formando bióloga é graças a ti, quando eu ainda era pequena tu estavas lá para me mostrar cada detalhe da natureza, e a responder os milhões de perguntas que

eu te jogava impaciente, e a todos os mil questionários que me fizeste para me ajudar a estudar quando estava no colégio, te agradeço por todas as oportunidades que me proporcionasse por todos estes anos, e por todo carinho e paciência. Muito obrigada mãe e pai, eu os amo muito, este trabalho dedico a vocês.

Aos meus amigos, se eu cheguei sã até aqui com toda a certeza foi graças a vocês haha. Em especial aos amigos da Faculdade, que atravessaram estes anos comigo, Fernanda, minha taurina favorita, estivemos juntas desde o começo e terminaremos juntas, um brinde a nossa grande amizade e claro ao bom chimarrão. Meu obrigado as Furonas (Elisa, Camila, Thamís), a gente tentou se juntar para o café, mas na minha formatura estaremos todas juntas de novo para tomar aquela cerveja merecida, vocês são maravilhosas, biólogas e museólogas que ainda vão chamar atenção de muita gente, se não do mundo. Camila, tu chegou de supetão em 2017, sem aviso prévio e disse que ia ficar, e ainda bem que ficou obrigada por todas as risadas, carinho e toda a ajuda. Conká fiquei pra trás, mas cheguei aqui, enfim, obrigada pela fofura e os abraços mensais no r.u. E a Mari, minha mais nova australiana, minha gratidão é imensa, me ensinaste muito, me fizeste alguém mais forte, obrigada por toda a ajuda e amor.

Aos amigos do condomínio obrigado pelas rodas de chimarrão, com certeza me fizeram muito bem todos esses anos. Em especial a minha Dudinha e minha Angelina, apesar das infinitas brigas vocês fazem parte da minha estória, e se depender de mim continuarão a fazer. E ao meu bff João, quem diria que chegaríamos a esse ponto ein?! Obrigada por todo apoio, por todas as conversas e parceria ao longo desses anos. Amo vocês.

E claro para aquelas de anos, aquelas em que não importa o tempo, à distância, estiveram e estão sempre aqui por mim. Vocês seguraram a minha mão, ouviram meus lamentos, acalmaram meus surtos, guardaram meus segredos, aguentaram minha personalidade, e agora irão brindar meu sucesso ao meu lado. Juliana e Paloma, eu não sei o que seria de mim sem a amizade de vocês, eu agradeço todos os dias por tê-las comigo, todo meu amor e gratidão.

E por fim, mas não menos importante, a todos meus professores, ao DEZG, Seu Álvaro, Rejane, e a todos que me ajudaram nesta etapa de minha vida. Obrigada.

1 Introdução

A polinização é uma das interações ecológicas mais importantes em nível de comunidade. Ela não só conecta mais de um milhão de organismos, mas também permite a reprodução das angiospermas e a sobrevivência de grande parte dos insetos. Atualmente, muita atenção tem sido dada nas relações mutualísticas planta-polinizador através do uso de redes de interações que fornecem um panorama mais amplo sobre a estruturação das interações nas comunidades (RECH et al., 2014). Esta abordagem é valiosa para compreender estas relações mutualísticas, mas acaba por não englobar todas as possíveis plantas visitadas pelos polinizadores. Isto ocorre, pois a amostragem de interações apresenta os mesmos problemas, potenciais vieses, restrições de amostragem e inventários, que uma estimativa grande do número de interações dentro das redes requer um esforço amostral maior e adequado (JORDANO, 2016). No entanto, ainda não encontramos uma amostragem explícita em interações ecológicas.

Desta forma, as relações mutualísticas planta-polinizador com o uso das redes de interações pode ser estudado sob duas perspectivas: fitocêntrica, que identifica parâmetros de interações planta-polinizador, registrando através de observações focais; e a perspectiva zoocêntrica, que é identificação de interações com base nos polinizadores, por exemplo, coletando o pólen do corpo dos animais (FREITAS et al. 2014). Ambas as perspectivas apresentam vantagens e limitações, nas quais a amostragem fitocêntrica pode apresentar erros ao não identificar polinizadores e visitantes existentes em plantas raras. Por outro lado, a amostragem zoocêntrica identifica os grãos de pólen aderidos às mariposas, que necessariamente não asseguram que o inseto tenha visitado ou polinizado aquela flor identificada, além de abranger uma escala espacial desconhecida. Desta forma,

utilizando as duas perspectivas para o estudo de interações poderia ser obtida uma descrição mais acurada destas na comunidade (FREITAS et al., 2014).

A ordem Lepidoptera pode ser dividida em borboletas e mariposas, que possuem estágios larvais de hábito fitófago, enquanto os adultos de diversas espécies são polinizadores, antófilos que se alimentam de néctar e grãos de pólen. Estes apresentam 90% das espécies na divisão Ditrysia (KRISTENSEN, 1998). As mariposas podem ser divididas, pelo seu comportamento, em dois grupos: um deles inclui a família Sphingidae em que as mariposas pairam em frente às flores ao consumir o néctar, e o outro representa o restante das mariposas que visitam as flores pousando nas mesmas (OLIVEIRA et al., 2014).

Mariposas da família Sphingidae constituem um grupo taxonômico bastante diverso (ca. de 1200 spp.) com ampla distribuição mundial (DE AVILA et al., 2010), sendo registradas 186 espécies para o Brasil. São organismos fundamentais na polinização, prestando serviços ambientais importantes e oferecendo subsídios para estudos ecológicos (MATOS et al., 2012). Por possuírem grande capacidade de voo e probóscide frequentemente longa, possibilitam a polinização de flores especializadas, incluindo aquelas com longas corolas que limitam o acesso de outros animais aos recursos florais. Plantas polinizadas por esfingídeos, normalmente apresentam antese floral noturna, coloração branca, corola profunda, base larga, e forte odor indicando grande quantidade de néctar, sendo classificadas como flores esfingófilas (FAEGRI & VANDER PIJL, 1966). Segundo BARÔNIO et al. (2016) grupos de plantas que compartilham os mesmos grupos de polinizadores têm um conjunto de características florais convergentes, permitindo a previsão dos polinizadores a partir destas. Essa previsibilidade seria dada devido as adaptações da planta em relação aos visitantes e das preferências do visitante em relação aos atributos florais.

Estudos palinológicos contribuem na caracterização de grãos de pólen de diferentes espécies visitadas por cada animal. Sendo morfologicamente distintos entre as espécies de plantas, essas diferenças têm relação com a sua forma de dispersão, com estruturas que favoreçam a fixação em animais ou a sua dispersão pelo vento ou água (ERDTMAN 1966; PHILBRICK E LES, 1996; CULLEY et al., 2002). Estudos sobre os grãos de pólen baseiam-se nas características morfológicas (tamanho, forma, aberturas e ornamentação) e na comparação destas características com outros grãos (JÚNIOR et al., 2006). Desta forma, um dos mais

importantes atributos que tornam os grãos de pólen adequados para estudos taxonômicos e sistemáticos está no fato de variarem em sua forma. Além disso, essa variação é herdável e mostra altos níveis de consistência dentro de um táxon, embora diferentes formas possam ser encontradas em uma mesma espécie (BLACKMORE, 2007).

Chupil (2013) apresentou o uso de grãos de pólen na identificação de plantas para examinar a partição de nicho alimentar entre beija-flores no sul do Brasil através da descrição de variáveis dos grãos de pólen coletados de 84 espécies de plantas. Para identificação foram usados dados de referência da literatura e elaboração de bancos de referência com as espécies focais do estudo, através da comparação de fotos, desenhos e descrições morfológicas. Para a análise dos grãos Chupil (2013) isolou os grãos com diferenciações morfológicas únicas, e as demais foram reunidas por sua similaridade morfológica, aplicando posterior análise discriminante. Das 84 espécies de plantas identificadas, foram obtidos um diferencial total em 45 espécies. Seus grãos de pólen foram medidos e classificados segundo sete grupos de características morfológicas. Em relação a similaridade dos grãos de pólen, em 23 espécies a discriminação foi de 100%. Este grupo junto com as espécies identificadas visualmente compõe mais de 54% do total das plantas coletadas. Vinte espécies apresentaram 80 – 99% de discriminação, as 19 espécies restantes apresentaram uma discriminação < 80%, indicando uma diferenciação de grãos de pólen com alta confiabilidade de identificação. Foi observado também que a utilização deste método mostrou-se eficaz nas espécies analisadas, desta forma foi aplicado o mesmo método ao pólen coletado de 1431 beija-flores capturados. A presença de pólen nos beija-flores foi baixa, sugerindo que estas aves podem não ser tão eficientes como polinizadores ou que algum fator comportamental, como a visita preferencial em bebedouros artificiais (onde não há pólen), pode estar interferindo neste resultado.

Fang; Huang (2014) efetuaram uma análise de rede direcionada de transferência de pólen em uma comunidade de insetos polinizadores analisando a deposição de pólen de estigmas de 57 espécies de plantas. O objetivo foi construir uma personificação das interações planta-planta em uma cadeia de montanhas no sudoeste da China. Foram registrados 3609 grãos de pólen heteroespecíficos que representaram 410 links entre 69 espécies de grãos identificados, além de 184 grãos de pólen não identificados. Desta forma, cada espécie de planta recebeu 7,2

espécies de pólen e doou para 5,5 outras espécies. Isto está relacionado com a posição do estigma, sendo que plantas com morfologias similares que partilham polinizadores têm maior potencial para competição por interferência, como sugerido em outros estudos (BERGAMO et al., 2018).

Alarcón (2010) estudou a congruência entre redes de visitas e as redes de transporte de pólen em uma comunidade de polinizadores de plantas da Califórnia, limitando-se às ordens de insetos mais associados à polinização (Coleoptera, Diptera, Hymenoptera e Lepidoptera). Após a coleta dos insetos, os grãos de pólen aderidos ao corpo desses animais foram identificados e classificados como coespecíficos, sendo aqueles pertencentes às espécies de plantas em que o inseto foi coletado, ou heteroespecíficos (aqueles que pertencem a outras espécies de plantas). Os grãos de pólen heteroespecíficos não foram identificados, pois se obteve pouca quantidade. Segundo suas análises e resultados, as redes de transporte de pólen apesar de serem mais específicas, são menores em termos de número de espécies, links e visitas, quando comparado com a amostragem de interações montada através de amostragem fitocêntrica. Isto sugere que as plantas interagem com menos polinizadores potenciais, pois os valores de conexão não tiveram grandes respostas para diferenças estruturais entre as visitas e a rede de transporte de pólen. Desta forma, informações sobre quais insetos visitantes carregavam grãos coespecíficos e suas quantidades é crucial para identificar interações mutualísticas e antagonistas.

Bosch et al. (2009) avaliaram as redes de plantas-polinizadores, adicionando a perspectiva dos polinizadores em um estudo de uma comunidade mediterrânea de mata no norte da Espanha. Foram observados 4265 links que correspondem a 19 plantas e 122 polinizadores, revelando um número significativo de interações, aumentando a conectância da rede em 1,43 vezes, sendo a conectância média da planta de 18,5 para 26,4, e a de polinizadores de 2,9 a 4,1. Novos links também foram encontrados, além da confirmação de links identificados através da observação focal e de mais quatro módulos definidos, que não eram aparentes nas observações focais. Isto reforça a importância dos estudos palinológicos em estudos de redes de interações.

A falta de estudos sobre a influência das redes de transporte de grãos de pólen relacionados às redes de interações, e de estudos morfológicos sobre os grãos de pólen aponta a necessidade de pesquisas visando informações

palinológicas obtidas através de polinizadores coletados, ajudando assim na identificação de interações mutualísticas. Desta forma, utilizamos a técnica de acetólise para análise e identificação do pólen aderido ao corpo de mariposas. A acetólise consiste na mistura de três ácidos (sulfúrico, láctico e anidrido acético) que quando aquecidos reagem na quebra da exina, membrana externa dos grãos de pólen, proporcionando assim uma melhor observação e identificação da estrutura interna do pólen (RAYNAL & RAYNAL, 1971). Desta forma, este estudo pretende identificar interações através de pólenes aderidos à probóscide e ao corpo das mariposas, e complementar a rede de interações esfingídeo-planta em uma área de campos sulinos produzida inicialmente através de observações focais (LAUTENSCHLEGER et al., 2018). Com isto, pretende-se aumentar a abrangência desta rede de interações, descrevendo-a de forma mais completa e acurada.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo identificar os grãos de pólen encontrados em esfingídeos (amostragem zoocêntrica) coletados em uma área campestre e no Horto Botânico Irmão Teodoro Luís (HBITL) (31°48'58"S, 52°25'55"W), visando complementar uma rede de interações obtida por amostragem fitocêntrica.

1.1.2 Objetivos Específicos

- (i) Coletar, montar e identificar grãos de pólen de plantas visitadas ou potencialmente visitadas por esfingídeos na área de estudo, visando elaborar uma palinoteca com grãos de pólen da região de estudo.
- (ii) Determinar o número de espécies de esfingídeos em que ocorreu a presença de pólen.
- (iii) Identificar através de pólen, possíveis interações não observadas em amostragens fitocêntricas.

1.2 Hipótese

Testamos a hipótese de que existem interações esfingídeo-planta que são negligenciadas nas amostragens fitocêntricas, as quais são reveladas através da abordagem zoocêntrica que foi aplicada neste estudo.

2 Material e Métodos

2.1 Área de estudo

As coletas foram realizadas no Horto Botânico Irmão Teodoro Luís (HBITL) (31°48'58"S, 52°25'55"W) (Figura 1A) e na estrada (31.78°S, 52.41°W) e entorno (31°48'05"S, 52°24'54"W) do Campus da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) (Figura 1B), ambos situados no município do Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil. O Horto Botânico Irmão Teodoro Luís ocupa 25 ha dentro da área da Estação Experimental Terras Baixas da Embrapa, localizada a aproximadamente 3 km do Campus Capão do Leão da UFPEL. O HBITL é uma Área de Preservação Permanente (GUERRA; STREHER; LÜDTKE; 2015) com mata nativa circundada por áreas de formações pioneiras (banhados) e por estepe Gramíneo-Lenhoso (campos) (SILVA et al. 2013).

O município do Capão do Leão está localizado em regiões geomorfológicas da Encosta do Sudeste e da Planície Costeira. Sua vegetação pertence ao Bioma Pampa, e possui fisionomias de Floresta Estacional Semidecidual, e de Formações Pioneiras (VELOSO; RANGEL FILHO; LIMA, 1991).

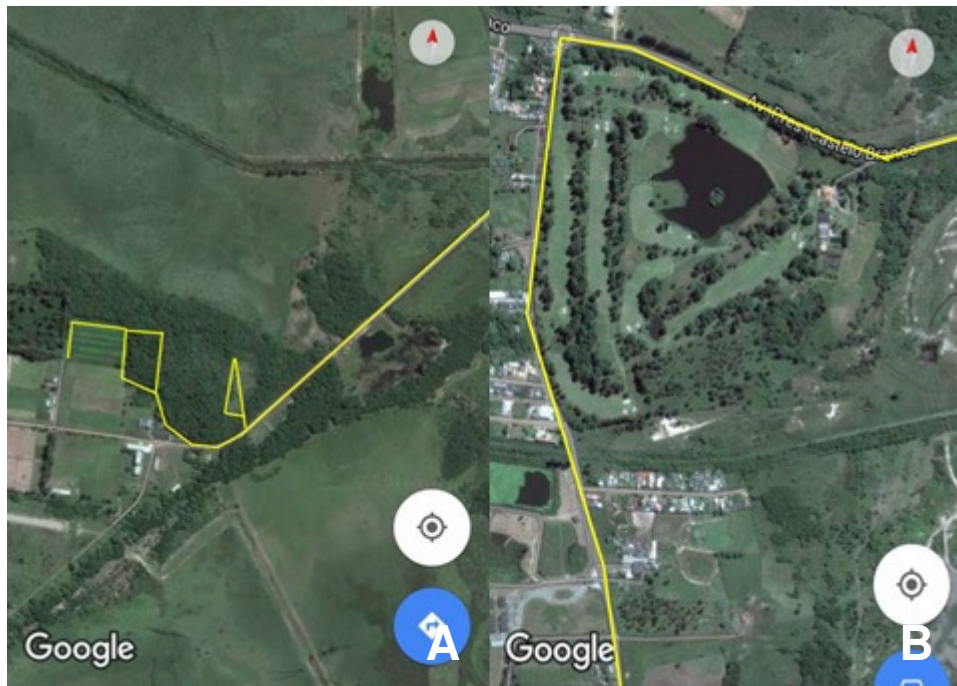


Figura 1 – Imagens realizadas através do Google Earth. (A) Horto Botânico Irmão Teodoro Luís. (B) Estrada e entorno do Campus Capão do Leão.

2.2 Amostragem

Montagem da rede fitocêntrica (baseada em observações focais): A rede de interações fitocêntrica esfingídeo-planta foi montada previamente a este estudo. Para isso os dados foram coletados durante saídas de campo realizadas entre novembro de 2015 e abril de 2017. As observações focais geralmente ocorreram entre 18h00min e 08h00min sob condições climáticas sem chuva e sem ventos fortes, através da observação de uma planta esfingófila a espera de visitas. Tanto as mariposas quanto as plantas polinizadas foram coletadas em campo. A coleta foi realizada com redes entomológicas e as mariposas coletadas foram colocadas em envelopes entomológicos contendo o horário da coleta, nome do coletor e a espécie da planta observada. As mariposas foram levadas para o Laboratório de Ecologia de Lepidoptera (LELEP) no Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética (DEZG) do Instituto de Biologia (IB) da UFPEL, onde foram devidamente montadas e identificadas. As plantas coletadas foram colocadas em prensas, para a confecção de exsicatas e posterior identificação (Tombadas no Herbário PEL) (LAUTENSCHLEGER, et al., 2018)

Inicialmente os animais eram coletados e colocados em câmaras mortíferas, o que gerava potencial perda ou mistura dos grãos de pólen. Por isso, passou-se a utilizar injeção de amônia visando minimizar a perda total dos grãos e a contaminação cruzada devido à colocação de distintas mariposas em uma mesma câmara.

Montagem da rede zoocêntrica (baseada em pólen): As interações foram identificadas baseadas na análise de grãos de pólen através da técnica de acetólise láctica (Aclac) de Raynal & Raynal (1971) (Tabela 1), realizada em uma Capela de Fluxo, descrita a seguir. Com uma pipeta graduada é colocado o anidrido acético em um Becker e, após, são adicionados os ácidos sulfúrico e láctico que devem ser lentamente misturados. Com uma seringa é coletado pólen da probóscide e do corpo das mariposas (Figura 2). Em seguida coloca-se o pólen coletado em uma lâmina, acrescentando uma ou mais gotas da solução de acetólise. A lâmina é aquecida por aproximadamente um minuto, para que o processo de quebra dos grãos de pólen tenha início. Após este procedimento, observamos no microscópio óptico (Olympus BX 40) se o conteúdo polínico saiu do grão. Ao término desta parte, foram colocadas uma gota de álcool e uma gota d'água morna, que posteriormente tiveram seu excesso retirado com um papel absorvente.

A finalização do processo de acetólise se dá com a colocação de gelatina glicerinada para fixação e conservação do material em lâmina permanente. A gelatina glicerinada é preparada com folhas de gelatina sem sabor incolor, nas medidas de uma folha (2,0 g) para cada 100 ml de água quente e 100 ml de glicerina. Após estas lâminas foram observadas no microscópio óptico para análise e identificação dos grãos de pólen. As lâminas obtidas a partir de pólenes coletados nos esfingídeos foram comparadas com a coleção palinológica de referência (lâminas-referência).

As lâminas-referência foram montadas a partir da coleta das flores esfingófilas observadas em campo, visando investigar a existência ou não de espécies que ainda não estavam na rede de interações montada a partir das observações focais (fitocêntrica). A probóscide de cada espécime foi removida e colocada em *eppendorfs*, e levados ao congelador, visando analisar possíveis grãos desprendidos das estruturas durante o processo de montagem.

Tabela 1 - Protocolo Aclac de acetólise para a análise de grãos de pólen das mariposas que foram coletadas no município do Capão do Leão, Rio Grande do Sul, entre novembro de 2015 e abril de 2017.

ACLAC	40	60
Anidrido acético	5,0 (1,25 ml)	30 (0,75 ml)
Ácido sulfúrico	1,0 (0,25 ml)	1,0 (0,25 ml)
Ácido láctico	4,0 (1,0 ml)	6,0 (1,5 ml)

Legenda: Pólens frágeis: aclac 40 e pólens fortes: aclac 60.



Figura 2 – Processo de coleta dos grãos de pólen aderidos ao corpo e probóscide das mariposas coletadas, para a confecção de lâminas.

2.3 Análise de dados

As redes de interações fitocêntrica (observação focal) e zoocêntrica (grãos de pólen) foram comparadas de forma descritiva em relação ao número de espécies de plantas e polinizadores, número de interações e conectância. O intuito de aumentar a lista das interações, identificando os grãos encontrados com o método de acetólise láctica, permitiu a discussão da eficiência e limitações de cada abordagem metodológica (rede zoocêntrica e rede fitocêntrica).

3 Resultados e Discussão

Rede fitocêntrica (baseada em observações focais): Foram realizadas 402 horas de observações focais, onde ocorreu o registro de 18 espécies de plantas, das quais 13 espécies receberam visitação de 17 espécies de Sphingidae. Em relação à rede de interações foram registradas 233 interações esfingídeo-planta e 46 links (interação entre uma espécie de planta com uma espécie de animal) através do método de observação focal (LAUTENSCHLEGER et al., 2018).

Rede zoocêntrica (baseada em pólen): Foram montadas 77 lâminas, sendo 64 lâminas de extrações de grãos de pólen das mariposas e 13 lâminas de extração de grãos de pólen das flores observadas em campo (lâminas-referência). Destas foram analisadas 43 lâminas de grãos de pólen das mariposas utilizando Redes de Catálogos Polínicos Online (RCPol) e bibliografias. Foi obtida uma vasta quantidade de grãos de pólen da planta esfingófila *Oenothera ravenii* W. Dietr. (35 lâminas; 81,4%). Em todas as 43 lâminas ocorreu a presença de pólen, incluindo das famílias Acanthaceae, Alismataceae, Asteraceae, Amaranthaceae, Amaryllidaceae, Apocynaceae, Celastraceae, Loranthaceae, Melastomataceae e Primulaceae. Também se obteve grãos de pólen de flores observadas na rede fitocêntrica, como *Oenothera ravenni*, *Nicotiana alata* Link & Otto, *Brugmansia suaveolens* (Willd) Sweet e *Inga* sp. 1. Sete esfingídeos possuíram indivíduos que carregaram mais de um tipo de pólen: *Aellopos tantalus* (Linnaeus, 1758), *Agrius cingulata* (Fabricius, 1775), *Eumorpha fasciatus* (Sulzer, 1776), *Eumorpha vitis* (Linnaeus, 1758), *Manduca contracta* (Butler, 1875), *Manduca florestan* (Stoll, 1782), e *Xyophanes*

tersa (Linnaeus, 1771) (Tabelas 2 e 3). Ou seja, das 17 espécies coletadas de esfingídeos, 41,2% de espécies carregavam grãos de pólen aderidos em seu corpo, sendo em algumas ocasiões de mais de uma espécie de planta (Tabela 3). Também foi observado que um indivíduo de *Manduca florestan* carregava grãos de pólen de *Oenothera ravenii* e *Brugmansia suaveolens*, indicando a visita de duas flores esfingófilas concomitantemente. Além disso, *Brugmansia suaveolens* foi uma espécie que não recebeu visitas durante as observações focais.

Tabela 2 - Lista de espécies de Sphingidae coletadas de indivíduos com grãos de pólen encontrados no município do Capão do Leão, Rio Grande do Sul, entre novembro de 2015 e setembro de 2018.

Espécies de esfingídeos	Número de indivíduos coletados	Número de indivíduos com grãos de pólen	Porcentagem de indivíduos da espécie carregando grãos de pólen
<i>Aellopos tantalus</i> (Linnaeus, 1758)	96	1	1,0%
<i>Agrius cingulata</i> (Fabricius, 1775)	09	1	11,1%
<i>Erinnyis ello</i> (Linnaeus, 1758)	06	0	0%
<i>Eumorpha fasciatus</i> (Sulzer, 1776)	19	6	31,6%
<i>Eumorpha labruscae</i> (Linnaeus, 1758)	03	0	0%
<i>Eumorpha triangulum</i> (Rothschild & Jordan, 1903)	04	0	0%
<i>Eumorpha vitis</i> (Linnaeus, 1758)	29	13	44,8%
<i>Manduca contracta</i> (Butler, 1875)	17	8	47,0%
<i>Manduca diffissa</i> (Butler, 1871)	03	0	0%
<i>Manduca florestan</i> (Stoll, 1782)	18	12	66,6%
<i>Manduca sp.</i>	03	0	0%
<i>Pachylia ficus</i> (Linnaeus, 1758)	01	0	0%
<i>Pachylia syces</i> (Hubner, 1819)	03	0	0%
<i>Perigonia passerina</i> (Boisduval, 1875)	12	0	0%
<i>Protambulyx strigilis</i> (Linnaeus, 1771)	01	0	0%
<i>Xylophanes anubus</i> (Cramer, 1777)	03	0	0%
<i>Xylophanes tersa</i> (Linnaeus, 1771)	09	2	22,2%
TOTAL	236	43	18,2%

Tabela 3 – Matriz zoocêntrica de interações indicando quais morfotipos de pólen foram encontrados nas distintas espécies de mariposas.

Pólen	Mariposa													
	Acanthaceae	Asteraceae	Alismataceae	Amaranthaceae	Amaryllidaceae	Apocynaceae	<i>B. suaveolens</i>	Celastraceae	<i>Inga</i> sp. 1	Loranthaceae	Melastomataceae	<i>N. alata</i>	<i>O. ravenni</i>	Primulaceae
<i>Aellopos tantalus</i>	-	-	-	X	-	-	-	-	X	-	-	-	-	X
<i>Agrius cingulata</i>	X	X	-	-	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Eumorpha fasciatus</i>	-	X	X	-	-	-	-	-	X	-	-	-	X	X
<i>Eumorpha vitis</i>	-	X	-	X	-	-	-	X	-	-	-	X	X	-
<i>Manduca contracta</i>	X	X	X	-	-	-	-	X	-	X	X	X	X	-
<i>Manduca florestan</i>	-	X	-	-	-	-	X	-	X	-	X	-	X	-
<i>Xylophanes tersa</i>	X	X	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	X	-

Tabela 4 – Lista de espécies de Sphingidae e das flores visitadas em redes fitocêntrica e zoocêntrica analisadas e coletadas no município do Capão do Leão, Rio Grande do Sul entre novembro de 2015 e setembro de 2018.

Sphingidae	Planta	Rede fitocêntrica	Rede zoocêntrica
<i>Aellopos tantalus</i> (01 espécime)	<i>Inga</i> sp.1	x	-
	Amaranthaceae	-	X
	Primulaceae	-	x
<i>Agrius cingulata</i> (01 espécime)	<i>Ipomoea alba</i>	x	-
	Acanthaceae	-	x
	Amaryllidaceae	-	x
	Apocynaceae	-	x
	Asteraceae	-	x
<i>Eumorpha fasciatus</i> (06 espécimes)	Alismataceae	-	x
	Asteraceae	-	x
	<i>Inga</i> sp.1	x	x
	<i>Oenothera ravenii</i>	x	x
	Primulaceae	-	x
<i>Eumorpha vitis</i> (13 espécimes)	Amaranthaceae	-	x
	Asteraceae	-	x
	Celastraceae	-	x
	<i>Oenothera ravenii</i>	x	x
	<i>Nicotiana alata</i>	x	x
<i>Manduca contracta</i> (08 espécimes)	Acanthaceae	-	x
	Alismataceae	-	x
	Asteraceae	-	x
	Celastraceae	-	x
	Lorathaceae	-	x
	Melastomataceae	-	x
	<i>Oenothera ravenii</i>	x	x
	<i>Nicotiana alata</i>	x	x
<i>Manduca florestan</i> (12 espécimes)	Asteraceae	-	x
	<i>Brugmansia suaveolens</i>	-	x
	<i>Inga</i> sp.1	x	x
	Melastomataceae	-	x
	<i>Oenothera ravenii</i>	x	x
<i>Xylophanes tersa</i> (02 espécimes)	Asteraceae	-	x
	Acanthaceae	-	x
	<i>Inga</i> sp.1	x	x
	<i>Oenothera ravenii</i>	x	x

Chupil (2013) evidenciou em seus estudos que a presença de grãos de pólen nos beija-flores foi baixa, sugerindo que estas aves podem não ser tão eficientes como polinizadores, ou que algum fator comportamental, como a limpeza da plumagem após a visita às flores pode estar interferindo neste percentual. Similarmente, neste estudo obteve-se uma baixa presença de grãos de pólen (18,2%) nos esfingídeos comparado com a quantidade de indivíduos que foram coletados, ou seja, dos 236 esfingídeos coletados na amostragem fitocêntrica, apenas 43 esfingídeos apresentaram grãos de pólen (Tabela 2). Porém esta baixa proporção de indivíduos carregando pólen pode ter sido negativamente influenciada, pois no início das amostragens o método de acondicionamento das mariposas era outro, onde pode ter ocorrido a perda de grãos de pólen. Todas as lâminas analisadas tiveram grãos de pólen, algumas delas com mais de um morfotipo, evidenciando a importância dos esfingídeos como polinizadores nesta comunidade campestre do sul do Brasil.

Outro fato a levar em consideração é que alguns dos morfotipos de pólen podem ter se aderido ao corpo das mariposas por acidente durante o voo, de modo que nem todas as interações registradas aqui se referem necessariamente à polinização. Além disso, foi observado que alguns aspectos dos grãos de pólen fazem com que estes tenham mais aderência no corpo e probóscide do animal, como demonstrado na espécie *Oenothera ravenii* (Figura 3A). Esta espécie possui os grãos de tamanho grande se comparado com os outros grãos analisados (Figura 3B), e fios de viscina, que ajuda na aderência dos grãos nas mariposas. Estas são características da família Onagraceae podendo possivelmente representar uma adaptação das espécies desta família à polinização por mariposas.

Neste estudo, o uso da rede zoocêntrica confirma que a interação dos esfingídeos com as flores como *Oenothera ravenii*, *Nicotiana alata* e *Inga* sp.1 são interações frequentes na comunidade (LAUTENSCHLEGER et al., 2018). Uma interação não observada com métodos fitocêntricos foi, porém, registrada com o método zoocêntrico: a planta esfingófila *Brugmansia suaveolens* (Figura 4A) que foi observada durante 5 horas e 50 minutos não obteve visitas de esfingídeos, porém seu pólen foi encontrado em um indivíduo de *Manduca florestan*. Isso evidencia a complementaridade das duas abordagens metodológicas. Além disso, foram encontradas outras dez famílias de plantas que não foram detectadas na rede fitocêntrica de interações. A adesão do pólen destas plantas pode representar novas

espécies polinizadas por estas mariposas, às quais não foram identificadas em observações fitocêntricas. Alternativamente, esse pólen pode ter se aderido acidentalmente durante o voo. Esse pode ser o caso de Melastomataceae que possui flores tipicamente polinizadas por abelhas (SILVA, 2000).

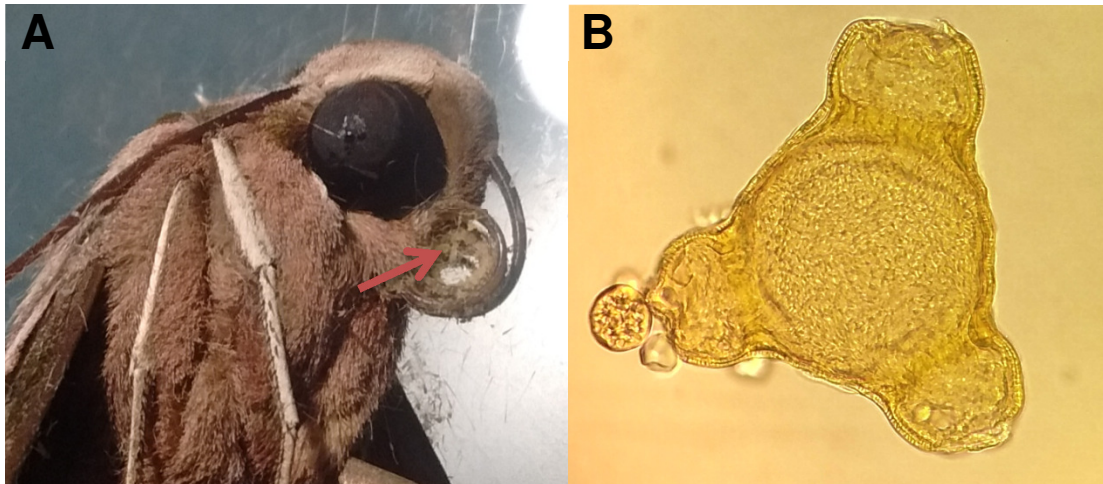


Figura 3 – (A) Foto de *Eumorphia fasciatus* (Sulzer, 1776) com grãos de *Oenothera ravenii* presos em sua probóscide. Lupa estereoscópica. (B) Grão de *Oenothera ravenii* ao lado de outro grão de pólen. Microscópio óptico (400x).

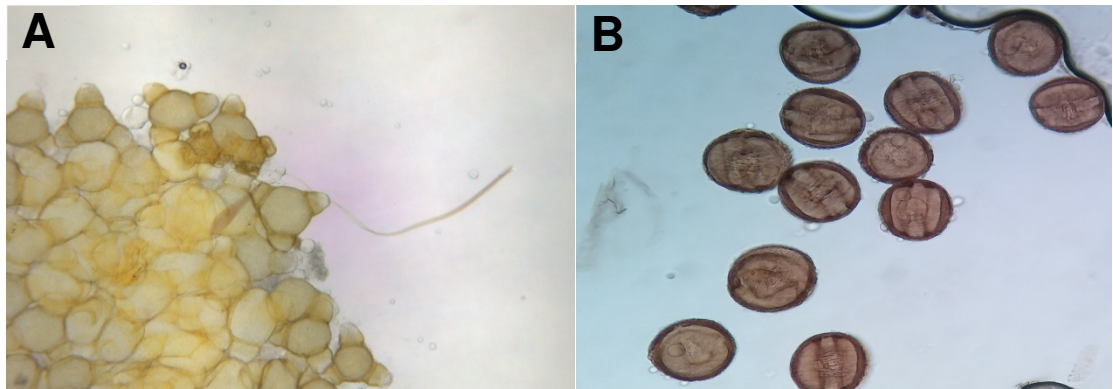


Figura 4 – (A) Grãos de pólen de *Oenothera ravenii*. Microscópio óptico (400x). (B) Grãos de pólen de *Brugmansia suaveolens*. Microscópio eletrônico (100x).

De acordo com Alarcón (2010) as redes de transporte de pólen (zoocêntricas) compostas por Coleoptera, Diptera, Hymenoptera e Lepidoptera são menores em termos de número de espécies, links e visitas, comparado com a rede fitocêntricas. *Oenothera ravenii* (Figura 4A) e *Nicotiana alata* (Figura 5 B - C) que estão na rede fitocêntrica de Lautenschlenger et al. (2018), possuíram grandes quantidades de grãos de pólen no corpo dos esfingídeos, evidenciando assim que seu pólen é de fato transportado, provavelmente resultando em polinização. Além destas espécies, também foram encontrados grãos de *Inga* sp.1 (Figura 6), observada na rede

fitocêntrica, que apesar de ter aparecido na rede zoocêntrica esteve pouco presente nos esfingídeos. Por outro lado, para os grãos pólen de famílias de plantas que não foram encontradas na amostragem fitocêntrica, não é possível ter certeza de que os grãos aderidos ao corpo tenham decorrido de visitação floral e resultaria em polinização (Freitas et al. 2014). Desta forma somente com a rede zoocêntrica não   possível confirmar a ocorrência de visitação e polinização, pois existem vários fatores que podem ocorrer, como a colisão do animal nas flores ou a deposição de pólen carregado pelo vento. Mas com estes dados podemos ampliar o estudo de rede de interações dos esfingídeos, realizando novas observações em flores que não considerar mos de interesse da família Sphingidae.

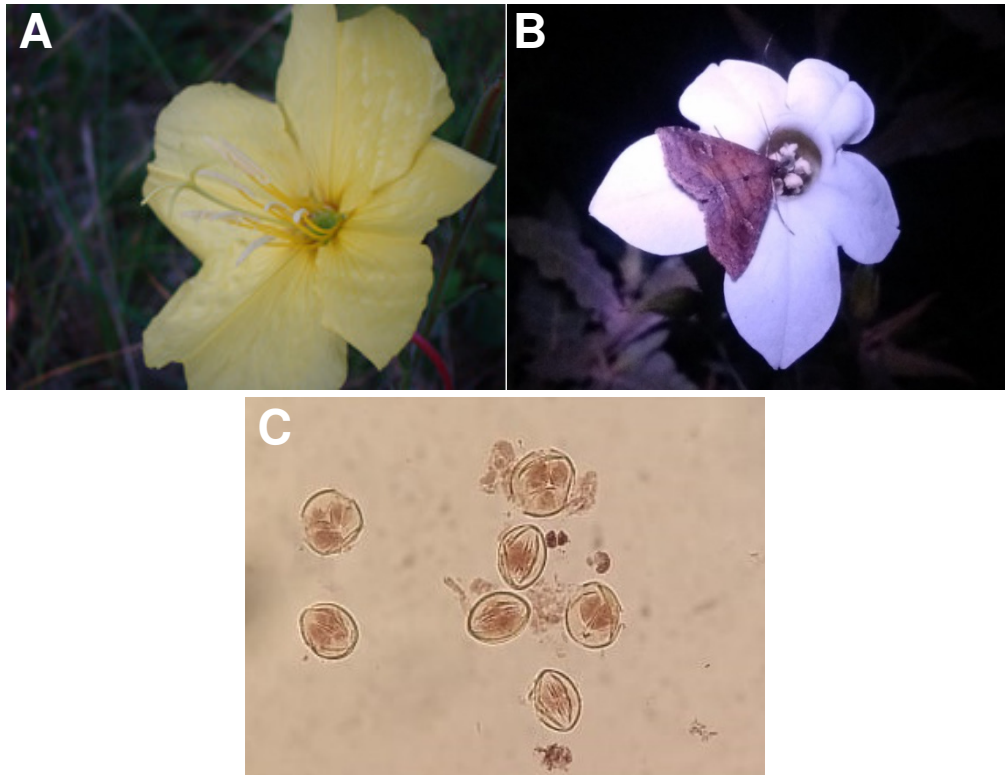


Figura 5 – (A) Flor de *Oenothera ravenii*. (B) Flor de *Nicotiana glauca*. (C) Grãos de pólen de *Nicotiana glauca*. Microscópio eletrônico (400x).

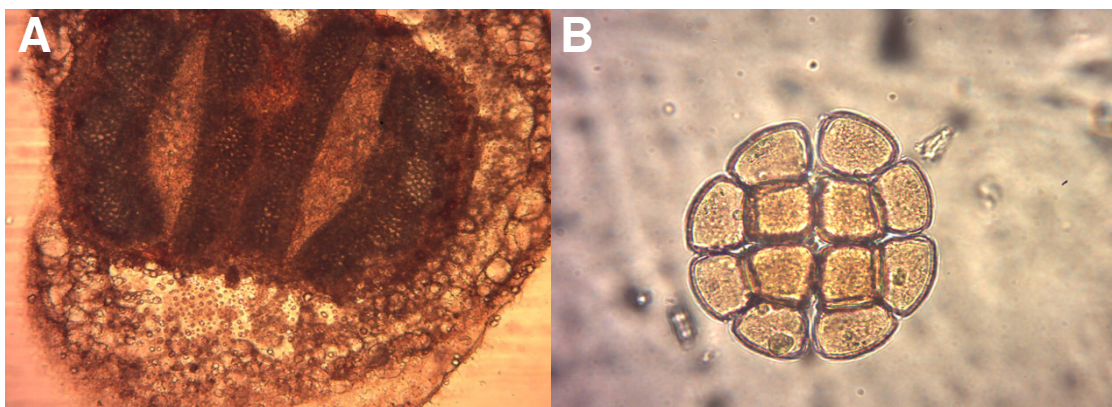


Figura 6 – (A) Antera de *Inga* sp.1. Microscópio eletrônico (100x). (B) Agrupamento do tipo Polyad de grãos de pólen de *Inga* sp.1. Microscópio eletrônico (400x).

No estudo realizado por Fang e Huang (2014) foram registrados 3609 grãos de pólen e apenas 69 desses grãos foram identificados. Isto ilustra a dificuldade na identificação do pólen em nível de espécie. Contudo, no presente estudo foram identificadas mais 10 famílias de plantas para a rede de interações, onde das sete espécies de Sphingidae (Figura 7) nas quais foram encontrados grãos de pólen, estas compartilhavam de dois a três morfotipos de pólen de diferentes plantas em uma noite. Isto evidencia que apesar da dificuldade de identificação, a rede de amostragem zoocêntrica amplia o conhecimento sobre a diversidade das flores utilizadas pelos esfingídeos.

Dentre os 236 indivíduos coletados (Tabela 2), 40,7% são da espécie *Aellopos tantalus* (Figura 7A). Contudo, apenas um indivíduo da espécie possuiu grãos de pólen em seu corpo, isto pode ter ocorrido porque *A. tantalus* possui uma probóscide relativamente curta (1,5 cm) em comparação à maioria dos esfingídeos, além de ter um hábito crepuscular e, portanto visitar flores com morfologias mais generalistas (e.g. flores curtas e não tubulares). Assim pode não tocar as estruturas reprodutivas das flores, tendo pouco ou nenhum pólen aderido ao corpo.

Das sete espécies de Sphingidae em que foram encontrados grãos de pólen, *Manduca contracta* (Figura 7E) foi a espécie que mais compartilhou grãos de pólen (Tabela 3). Além disso, 47% dos indivíduos desta espécie carregaram pólen, perdendo apenas para a *Manduca florestan* (Tabela 2, Figura 7F), de forma que esta espécie possui 66,6%, mas só compartilha cinco morfotipos de grãos de pólen. Contudo, dentro destes se encontram três espécies que estão na rede fitocêntrica (Tabelas 2 e 3).

Ipomoea alba esteve na rede fitocêntrica, mas não na rede zoocêntrica (Tabela 4). Apesar de *I. alba* ter características esfingófilas, em 3 horas e 40 minutos de observação, apenas um indivíduo foi coletado visitando a flor. A infreqüência de visitas de esfingídeos nesta planta pode estar ocorrendo porque a mesma dispõe de uma corola muito longa, impossibilitando a visitação da grande maioria dos esfingídeos que possuem probóscides curtas. Isso é corroborado pela única visitação registrada que foi realizada por *Agrius cingulata* (Figura 7B), que possui uma probóscide de 11,5 cm. Ainda assim, foram encontrados outros morfotipos de pólen na lâmina obtida a partir deste espécime.

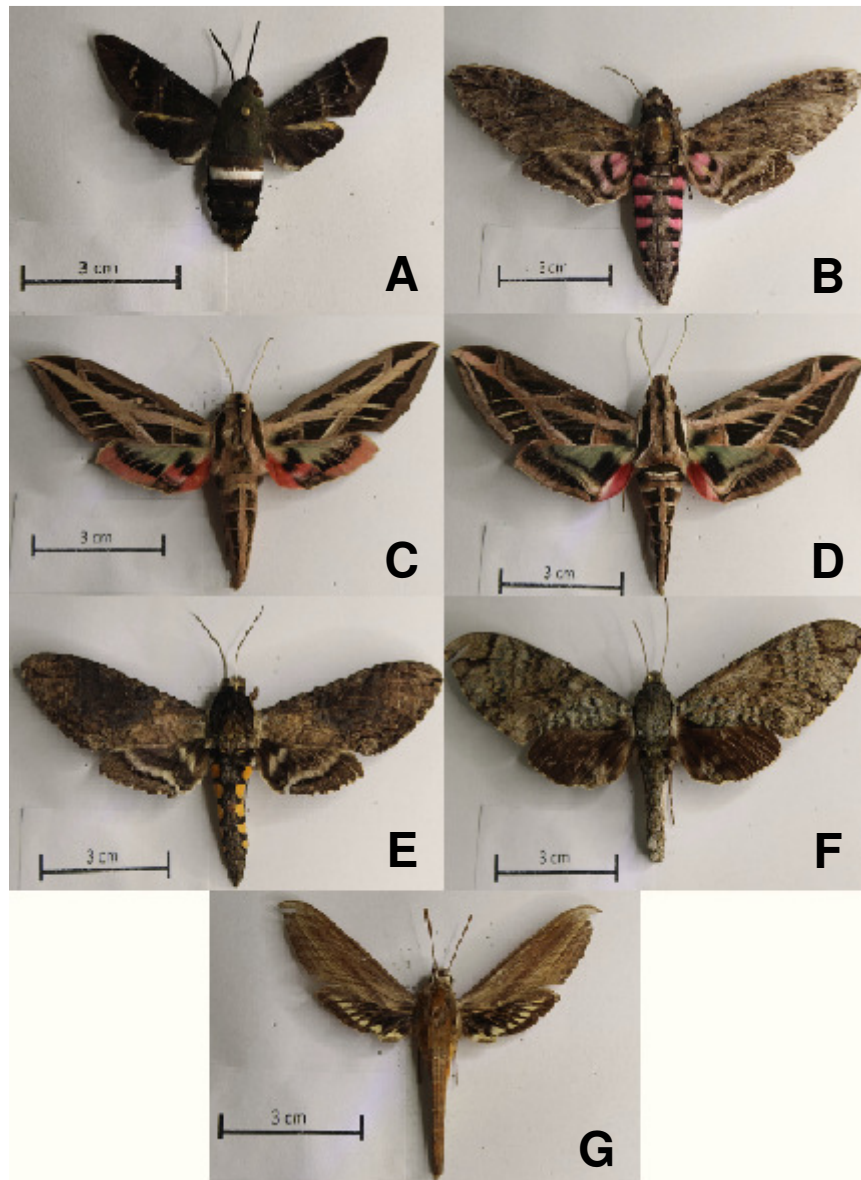


Figura 7 – Espécies de Sphingidae que ocorreram na rede zoocêntrica. (A) *Aellopos tantalus* (Linnaeus, 1758) (B) *Agrius cingulata* (Fabricius, 1775) (C) *Eumorpha fasciatus* (Sulzer, 1776) (D) *Eumorpha vitis* (Linnaeus, 1758) (E) *Manduca contracta* (Butler, 1875) (F) *Manduca florestan* (Stoll, 1782) (G) *Xylophanes tersa* (Linnaeus, 1771).



Figura 8 – Morfotipos de grãos de pólen que ocorreram na rede zoocêntrica. (A) Celastraceae (B) Amaranthaceae (C) Acanthaceae (D) Loranthaceae (E) Amaryllidaceae (F) Alismataceae (G) Melastomataceae (H) Apocynaceae (I) Asteraceae (J) Primulaceae.

4 Conclusões

Através da amostragem zoocêntrica foi possível a identificação de espécies de plantas esfingófilas obtidas na amostragem fitocêntrica, e de novos grãos de pólen pertencentes a outros morfotipos. Além disso, também nos permitiu a formação de uma palinoteca dos grãos de pólen da região. Dentre as 17 espécies de esfingídeos coletados, sete destas foram encontrados grãos de pólen utilizando a amostragem zoocêntrica. Além disso, foi encontrado pólen de *Brugmansia suaveolens*, que foi observada em campo sem o registro de visitas.

Existem interações esfingídeo-planta que são negligenciadas nas amostragens fitocêntricas, as quais foram reveladas através da abordagem zoocêntrica, corroborando a hipótese deste trabalho. Estudos desenvolvidos abordando a rede zoocêntrica são escassos, porém, podem contribuir adicionando espécies de plantas em redes de interações montadas a partir da amostragem fitocêntrica.

A grande dificuldade para identificação exata dos grãos de pólen é, porém uma limitação devido à grande escassez de estudos da morfologia e taxonomia desses grãos. Por isso, é recomendável a elaboração de coleções de referência de pólen para a região, o que facilitará estudos futuros que usam grãos de pólen para identificar as interações planta-polinizador.

Referências

ALARCON, R. Congruence between visitation and pollen-transport networks in a California plant-pollinator community. **Journal Compilation - Oikos**, p. 35-44, 2009.

BARONIO, G. J. et al. Plantas, polinizadores e algumas articulações da biologia da polinização com a teoria ecológica. **Rodriguésia**. v. 69, n. 2, p. 275-293, 2016.

BERGAMO, P. J., RECH, A. R., BRITO, V. L., SAZIMA, M. Flower colour and visitation rates of *Costus arabicus* support the 'bee avoidance' hypothesis for red-reflecting hummingbird-pollinated flowers. **Functional Ecology**. v. 30, n. 5, p.710-720, 2016.

BLACKMORE, S. Pollen and spores: microscopic keys to understanding the earth's biodiversity. **Plant Systematics and Evolution**.v.263.p.3-12. 2007.

BOSCH, J. et al. Plant-pollinator networks: adding the pollinator's perspective. **Ecology Letters**, v.12, p. 409-419, 2009.

CHUPIL, Henrique. **Uso de grãos de pólen na identificação de plantas e para examinar a partição de nicho alimentar entre beija-flores no sul do Brasil**. 2013. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação) – Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

CUDA, J. P., A. P. FERRITER, V. MANRIQUE, MEDAL, J.C. Brazilian pepper tree task force chair. Interagency Brazilian Peppertree (*Schinus terebinthifolius*) **Management Plan for Florida**. 2ed. 2006.

DE AVILA, Rubem Samuel Junior. et.al. Tipos polínicos encontrados em esfingídeos (Lepidoptera, Sphingidae) em área de Floresta Atlântica do Sudeste do Brasil: uso da palinologia no estudo de interações ecológicas. São Paulo: **Revista Brasil. Bot.**, v.33, n.3. 2010. 424p.

ERDTMAN, G. 1966. Pollen morphology and plant taxonomy: Angiosperms. **New York: Hafner Publishing Company**. 485p.

FAEGRI K., VAN DER PIJL, L., 1966: **The principles of pollination ecology**. – Oxford: Pergamon Press.

FANG, Q.; HUANG, S. Q. A directed network analysis of heterospecific pollen transfer in a biodiverse community. **The Ecological Society of America**, v. 94, n. 5, p. 1176-1185, 2013.

FREITAS, L., VIZENTIN-BUGONI, J., WOLOWSKI, M., SOUZA, J. M. T., VARASSIN, I. G. Interações planta-polinizador e a estruturação das comunidades. In: RECH, A. R., AGOSTINI, K., OLIVEIRA, P. E., MACHADO, I. C., (Org.). **Biologia da polinização**, 1 ed. Rio de Janeiro, 2014. Pág 373.

GUERRA, E.; SUSIN, N.; LUDTKE, R. Plantas trepadeiras do Horto Botânico Irmão Teodoro Luis, sul do Rio do Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.13, n.4, p.201-209, 2015.

JORDANO, P.; Advances and Challenges in the study of ecological networks: Sampling networks of ecological interactions. **Functional Ecology**, Sevilla, Spain, v. 30, p.1883-1893, 2016.

KRISTENSEN, N. P.; Lepidoptera: Moths and Butterflies 1. Evolution, Systematics and Biogeography. **Handbuch der Zoologie/Handbook of Zoology**. Walter de Gruyter, Berlin & New York, v. 35, p. 491, 1998.

LAUTENSCHLEGER, A., CAVALHEIRO, L., CHAGAS, J. de S., VIZENTIN-BUGONI, J., ISERHARD, C., Fatores Estruturadores de uma Rede de Interações Esfingídeo-Planta no Extremo Sul do Brasil. In: Trabalho de Conclusão de Curso., 2018, Pelotas: UFPEL, 2018.

MATOS, Simone Jung. et al. Diversidade, similaridade e composição de espécies de Sphingidae em quatro áreas de Cerrado. Anais do IV Seminário de Pesquisa e Iniciação Científica do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. **Anais do IV Seminário de Pesquisa e Iniciação Científica do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade.**, v.1, p. 56-57. 2012.

OLIVEIRA, R., JUNIOR, J. A. D., RECH, A. R., AVILA, R. S. Polinização por lepidopetos. In: RECH, A. R., AGOSTINI, K., OLIVEIRA, P. E., MACHADO, I. C. (Org.). **Biologia da polinização**, 1 ed. Rio de Janeiro, 2014. Pág 235.

RAYNAL, A. & RAYNAL, J. 1971. Une technique de préparation des grains de pollen fragiles. *Adansonia* 11: 77-79.

RECH, A. R., WESTERKAMP, C. Biologia da polinização: uma síntese histórica. In: RECH, A. R., AGOSTINI, K., OLIVEIRA, P. E., MACHADO, I. C. (Org.). **Biologia da polinização**, 1 ed. Rio de Janeiro, 2014. Pág 24.

SILVA, J. M. et al., Borboletas frugívoras (Lepidoptera:Nymphalidae) no Horto Botânico Irmão Teodoro Luis, Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Biotemas**. v. 26, n. 1, p. 87-95, 2013.

SILVA, S. C. S. **Biologia Reprodutiva e Polinização em Melastomataceae no Parque do Sabiá, Uberlândia, MG**. 2000. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2000.

VELOSO, H. P.; RANGEL FILHO, A. L. R.; LIMA, J. C. A. **Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal**. 1.ed. Rio de Janeiro: IBGE, 1991. 124 p.