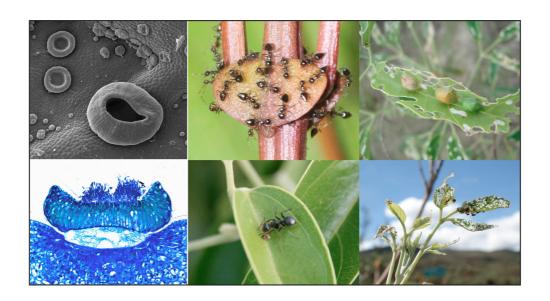
Anselmo Nogueira

Evolução e ecologia dos tricomas em Bignonieae (Bignoniaceae): estruturas morfológicas de defesa anti-herbivoria?



Evolution and ecology of trichomes in Bignonieae (Bignoniaceae): morphological structures of anti-herbivory defense?

São Paulo Outubro de 2011

		3 T	•
Anse.	lmo	Nos	gueira

Evolução e ecologia de tricomas em Bignonieae (Bignoniaceae): estruturas morfológicas de defesa anti-herbivoria?

Evolution and ecology of trichomes in Bignonieae (Bignoniaceae): morphological structures of anti-herbivory defense?

Tese apresentada ao Instituto de Biociências para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Botânica

Orientadora: Dra. Lúcia G. Lohmann

Co-Orientador: Dr. Pedro J. Rey

São Paulo Outubro de 2011

Nogueira, Anselmo

Evolução e ecologia de tricomas em Bignonieae (Bignoniaceae):

estruturas morfológicas de defesa anti-herbivoria?

Número de páginas: 222

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica.

1. NEFs; 2. Formigas; 3. Herbivoria; 4. Interações biológicas; 5.

Macroevolução; 6. Seleção natural.

I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Botânica.

Comissão Julgadora

Prof(a). Dr(a).		Prof(a). Dr(a).	
Prof(a). Dr(a).		Prof(a). Dr(a).	
-			
	Profa. Dra. Lúcia	a Garcez Lohmann	

ORIENTADORA

Dedico Aos meus país E a mínha querida irmã.

"Mas o pobre vê nas estrada

O orvaio beijando as flô

Vê de perto o galo campina

Que quando canta muda de cor

Vai moiando os pés nos riacho

- Que água fresca, nosso Senhor!

Vai oiando coisa a grané

Coisas qui pra mode vê

O cristão tem que andar a pé..."

(Luiz Gonzaga & Humberto Teixeira, 1951)

Agradecímentos

Inicialmente gostaria de agradecer às instituições que acolheram e financiaram a execução desta tese: à FAPESP pela bolsa de Doutorado (2007/54917-1) e Auxílio Regular à Pesquisa (2007/55433-8); a todos os funcionários e professores do IB-USP em especial o Laboratório de Sistemática — Departamento de Botânica, IB-UNESP campus Botucatu em especial ao Centro de Microscopia Eletrônica, ao Departamento de Biología Animal y Vegetal da Universidad de Jaén (Espanha). Aos dirigentes e funcionários de todas as Unidades de Conservação e seus entornos: Parque Estadual de Grão Mogol, Parque Estadual Morro do Chapéu, Parque Nacional da da Chapada Diamantina, Reserva Florestal Adolpho Ducke, Parque Nacional do Viruá, Parque Nacional da Serra da Bocaína.

Agradeço especialmente aos meus orientadores Lúcia Garcez Lohmann e Pedro Zamora Rey por terem tornado possível a concretização deste projeto. A Lúcia pela acolhida em São Paulo quando do meu retorno de terras distantes, pela disposição e esforço em abrir portas para execução de um projeto que misturasse biologia evolutiva com uma pitada de ecologia, e principalmente, pelo empenho em corrigir (projetos), submeter, corrigir (relatórios), submeter, e tantas vezes aceitar o ir e vir de papéis (e da construção dos mesmos), para que nada faltasse no campo, no laboratório, nas análises... em todas as etapas da construção desta tese. Ao Pedro pela inspiração na ciência e sua prática, nas decisões cruciais de desenho experimental, pela paciência em passar um pouco da sua experiência como pesquisador, e pela naturalidade em explicar um pouco mais sobre biologia evolutiva e suas interfaces com tantas outras áreas da biologia.

A todos aqueles que se dispuseram a "palpitar" e participar deste projeto, e que contribuíram com discussões sobre a tomada de dados, refinamento das hipóteses, dentre tantas partes deste projeto que sempre precisou de auxílio para sua concretização, em especial as **Profas. Elza Guimarães** e **Silvia Machado** (UNESP - Botucatu), **Prof. Julio Alcantara** (Universidade de Jaen - Espanha), **Fabricio Baccaro** (INPA - Manaus), **Rodrigo Feitosa** (Museu de Zoologia, USP - São Paulo), **Miriam Kaheler** e **Marcelo Pace** (IB-USP). Não poderia esquecer de agradecer aos pesquisadores que contribuíram na reestruturação da proposta original do projeto no momento da minha qualificação: **Prof. Glauco Machado**, **Prof. Paulo Inácio Prado** e ao **Prof. Antonio Salatino**. Agradeço especialmente ainda aqueles que se aventuraram comigo na tomada de dados, e tornaram esses momentos mais alegres, e a coleta de dados menos árdua, em especial à **Patrícia F. Bueno**, **Jenifer Lopez**, **Juliana El-Ottra**, **Cintia Luiza**, **Marcelo Devecci**, **Eliza Carneira** e **Miriam Kaehler**.

A todos do Laboratório de Sistemática e da botânica no IB-USP pela convivência nos momentos de sorrisos e nos momentos mais difíceis nesses últimos 4 anos. Em especial, gostaria de agradecer à Juliana G. Rando, Maria Ana Farinaccio, Cintia Luiza, Juliana El-Ottra, Alexandre Zuntini, Suzana Alcantara, Benoit, Mauricio Watanabe, Pedro Fiaschi, Miriam Kaehler, Marcelo Pace, Juliana Lovo, Herbert Serafim, Fabiana Firetti, Luiz Henrique, Leonardo Borges, Maria Cláudia, Maria Fernanda; não podendo esquecer jamais do Abel e da Fabi, e mais recentemente, da Vivi Jono que me ajudou bastante também com muitos pitacos no inglês, dentre outros. A todos meu muito obrigado por todos os momentos, e pela paciência e ajudas mil no decorrer do doutorado.

A todos os meus amigos, sempre me apoiando nesta trajetória, em especial para a Dani, Erica, Gustavo Tanaka, Daniel Pergher, Cristiane Jurinitz, Priscila Rebollo, Camila Castanho, Mariana Centini, Fabio Fertassi, Daniel Cavalgari, Ricardo da Costa (Pai), Luciana Girardelli (Mãe), Cintia, Thais, Luana, Robson, Samara, Edson, Regina, Alvininha, Gisele, Andréia, Cristina. Pelos caminhos da pesquisa, em especial a Flávia Costa, que não parou de me auxiliar e inspirar por esses anos, a ela mais uma vez meu agradecimento e amizade.

À querida **Juliana Rando** pelas descobertas mais doces de carinho e amor em meio a loucura deste final de tese!

Aos meus pais **Salviano e Sônia** e a minha querida irmã **Lívia** toda minha gratidão, meu respeito e meu amor em primeiro lugar... E aos Orixás e todos os Guias, em especial ao **Seu João Batista**. A toda essa proteção e Força Maior que me acompanham e me auxiliam a todo instante, dentro e fora da ciência, nessa e na outra vida! Salve a Umbanda! Epapabá Oxalá! Ogunhê! Okearô Oxossi! Atoto Abaluaê! Laroiê Exu!



SUMÁRIO

Resum	10	1
Abstra	ıct	5
Introd	ução Geral	9
Referênci	as	17
Capítulos	:	
-	"Trichome evolution in Neotropical lianas (Bignonieae, Bignoniaceae)" (em inglês)	21
Cupulito 1	Introdução	
	Métodos	
	Resultados	
	Discussão	
	Referências	
	Tabelas e figuras	
Canítulo 2	2. "Do extrafloral nectaries present a defensive role against herbivores in two species of	
_	eae in a Neotropical savannas?" (em inglês)	-
Digilolliac	,	
	Introdução	
	Métodos	
	Resultados	
	Discussão	
	Referências	
	Tabelas e figuras	
Capítulo 3	3. "Evolution of Extrafloral Nectaries: Interaction with trichome types and selective regi	me changes"
(em inglês	s)	123
	Introdução	129
	Métodos	132
	Resultados	136
	Discussão	139
	Referências	145
	Tabelas e figuras	149
Capítulo 4	4. "Geographic mosaic of an ant-plant guard system: Anemopaegma album and its ants."	' (em
inglês)		169
<i>C</i> ,	Introdução	
	Métodos	
	Resultados.	
	Discussão	
	Referências	
	Tabelas e figuras	
Consider	ações finais e perspectivas	
Constacts	atuly iiiais t pti yptuvas	

RESUMO

Este trabalho focou nos aspectos evolutivos e ecológicos dos tricomas em espécies da tribo Bignonieae (Bignoniaceae), e no potencial papel defensivo dessas estruturas no aumento da resistência das plantas frente aos herbívoros. Esta tese caracterizou quatro morfotipos de tricomas encontrados nas partes vegetativas das plantas da tribo Bignonieae morfologicamente, estudou os padrões macro-evolutivos destes tricomas e o papel funcional dos tricomas pateliformes secretores de néctar em diferentes escalas de tempo e espaço.

O primeiro capítulo descreveu os quatro tipos de tricomas micro e macromorfologicamente, e sua relação com a história filogenética das espécies da tribo Bignonieae. Quatro tipos de tricomas distintos foram reconhecidos: tricomas não glandulares (ng), tricomas glandulares peltados (gp), tricomas glandulares estipitados (ge), e tricomas glandulares pateliformes/cupulares (P/C). Três destes tricomas provavelmente já estavam presentes no ancestral da tribo Bignonieae (i.e., não glandulares, glandulares peltados e glandulares pateliformes/cupulares) enquanto os tricomas glandulares estipitados surgiram mais recentemente e múltiplas vezes dentro da tribo. Além disso, realizamos uma revisão das terminologias aplicadas a esses tricomas bem como sugerimos uma padronização dos tipos de tricomas para o grupo de forma a diminuir a divergência entre os trabalhos já publicados.

O segundo capítulo testou a eficiência dos tricomas pateliformes secretores de néctar (nectários extraflorais) em duas espécies de *Anemopaegma* das savanas brasileiras. Essas duas espécies atraíram mais formigas que plantas vizinhas, com os indivíduos de *Anemopaegma* com maiores quantidades de nectários sendo visitados por um número maior de formigas que as plantas com um número menor de nectários (variação intra-populacional). No entanto, não foi possível observar um efeito dos nectários e formigas sobre a herbivoria e o desempenho das plantas como esperado pela hipótese de defesa mediada por essas estruturas. Hipóteses alternativas foram utilizadas para discutir os resultados, incluindo uma discussão sobre o possível custo/benefício de tais estruturas em diferentes ambientes (florestas e savanas)

relacionados com a história filogenética do grupo, além da variação das interações esperada entre populações segundo a hipótese de mosaico geográfico.

O terceiro capítulo testou o papel defensivo do sistema planta-formiga mediado pelos nectários extraflorais no contexto filogenético da tribo Bignonieae. Espécies de plantas com um número maior de nectários foram visitadas por um número maior de formigas (teste controlado pelas relações de parentesco entre as espécies). Além disso, espécies mais proximamente relacionadas apresentaram uma diferença na abundância de nectários extraflorais maior do que o esperado pelo modelo neutro de evolução, gerando um padrão de convergência dessas estruturas na tribo Bignonieae. Esse desvio no padrão evolutivo esperado pode ter sido causado por forças direcionais de seleção e momentos de contra-seleção, dado o balanço entre custo-benefício dos nectários extraflorais para as plantas. Neste contexto, dois fatores foram testados para explicar o desvio na evolução da abundância de nectários na tribo Bignonieae: (1) mudança de habitat das florestas para as savannas (fatores extrínsecos); (2) surgimento de novos caracteres morfológicos como outros tipos de tricomas na superfície das plantas (fatores intrínsecos). Ambos fatores podem ter interferido nas interações formigaplanta e no padrão de evolução dos nectários. Dessa forma, a ocupação das savanas levou a uma diminuição do número de nectários (provável contra-seleção dessas estruturas), enquanto o surgimento de tricomas glandulares adesivos teve o mesmo efeito sobre os nectários. Ambos resultados são discutidos considerando a condicionalidade das interações em função da variação biótica (formigas e herbívoros) entre habitats, e também do "trade-off" entre os caracteres de defesa.

O quarto capítulo testou a teoria de coevolução em mosaico geográfico no sistema planta-formiga-herbívoro em 10 populações da espécie de savana *Anemopaegma album*. Não foram encontradas correlações entre os nectários (e variáveis descritoras do néctar), a abundância de formigas visitantes, a herbivoria ou as variáveis de performance das plantas entre as populações. Esse padrão esteve associado principalmente a variação na assembléia de formigas, a qual foi dominada por formigas do gênero *Crematogaster* em uma das populações, mas dominadas por formigas do gênero *Camponotus* na grande maioria das outras populações.

No entanto, 3 das 10 populações estudadas apresentaram um alto número de plantas sem formigas, diminuindo muito as chances dessas populações serem defendidas frente aos herbívoros pelos nectários. A abundância de formigas esteve relacionada negativamente com a herbivoria, e positivamente com as variáveis de performance das plantas entre as populações. Das 10 populações amostradas, 5 delas tiveram os nectários acoplados (do inglês, "matched") com as formigas visitantes, embora o tipo de acoplamento tenha variado entre elas. Dessas 5 populações, somente 3 tiveram uma produção positiva de folhas e baixa herbivoria, no qual duas delas tiveram alta abundância de nectários nas folhas e foram dominadas por formigas do gênero Camponotus (maiores em tamanho, mas com baixa capacidade de recrutamento). Já a terceira população teve em média a menor abundância de nectários nas folhas, e a mesma apresentou o maior número de formigas por planta (e maior frequência), em geral formigas do gênero Crematogaster (menores em tamanho mas com grande capacidade de recrutamento). Por serem menores em tamanho, tais formigas utilizaram a secreção dos nectários quase que individualmente. Nem a abundância de nectários, nem as formigas ou mesmo a herbivoria estiveram estruturados espacialmente, corroborando, a hipótese de mosaico geográfico para as interações formiga-planta-herbívoro em A.album. Neste contexto, as três populações com as interações formiga-planta "mached" foram consideradas "hot-spots" das interações, nas quais as populações atingiram os valores mais altos das variáveis de performance das plantas, enquanto as demais foram consideradas "cold-spots". A maioria das populações "cold-spots" foi explicada pela falta de formigas suficientes para que as interações com as plantas pudessem se tornar efetivas na defesa frente aos herbívoros, mas outros processos também foram considerados para discutir os resultados apresentados neste trabalho.

ABSTRACT

This thesis focused on the evolutionary-ecology of trichomes in the tribe Bignonieae (Bignoniaceae), and in the potential defensive role of these structures against herbivores. More specifically, we characterized four trichome morphotypes found in vegetative plant parts of representatives of the Bignonieae, as well as studied the macro-evolutionary patterns of these trichomes, and the functional role of patelliforme nectar secreting trichomes in different scales of time and space.

The first chapter describes four different trichome types micro and macromorphologically, as well as investigates their evolutionary patterns during the history of
Bignonieae. The four different trichome types recognized are: non-glandular trichomes (ng),
glandular peltate trichomes (gp), glandular stipitate trichomes (gst), and glandular
patteliform/cupular trichomes (P/Cgt). Our analyses indicated that three of these trichomes
were likely already present in the most recent common ancestor of the tribe Bignonieae (i.e.,
non glandular, glandular peltate, and glandular patteliform/cupular), while the glandular
stipitate trichomes evolved more recently and multiple times during the history of the tribe.
Results from this study were combined with a literature review in order to revise the trichome
terminology and propose standardized names for the various trichome types currently found in
the group.

The second chapter tested the efficiency of patelliform nectar-secreting trichomes (extrafloral nectaries, EFNs) in two species of *Anemopaegma* of the Brazilian savannas. These two species attracted more ants than neighboring plants, with individuals that presented higher amounts of EFNs being visited by a higher number of ants than plants with lower amounts of EFNs (intra-population variation). Nonetheless, no effect of EFNs and ants was observed on herbivory nor on the performance of the studied plants, contradicting the expectations of the mediated EFNs defense hypothesis. Alternative hypotheses were also considered including the cost/benefits model to understand the outcomes of ant-plant interaction: (1) phylogenetic inertia hypothesis that connect EFNs-ant interactions with the plant transitions between

different environments (forests to savannas); and (2) geographic mosaic hypothesis that predict differences in the outcomes of ant-plant interactions across populations.

The third chapter tested the defensive role of extrafloral nectaries in the context of the phylogenetic history of Bignonieae. Species of plants with a higher number of EFNs were visited by a higher number of ants (test controlled by phylogeny). In addition, closely related species presented a higher difference in the abundance of EFNs than expected under the neutral model of evolution. Such deviation may have resulted by directional forces of selection and moments of counter-selection, given the costs and benefits of the extrafloral nectaries for the plants. Two specific factors were considered as the major possible determinants of the evolutionary patterns of the EFNs: (1) change of habitat from forests to savannas (extrinsic factors); and (2) emergence of new morphological characters such as other trichome types over the plant's surface (intrinsic factors). Both factors might have altered the ant-plant interactions and the evolution of nectaries. The occupation of the savannas was associated with a decrease in the number of nectaries (likely due to counter-selection of these structures), while the evolution of adhesive glandular trichomes presenting the same effect on the nectaries. Both results are discussed in the light of the biotic variation (ants and herbivores) encountered between habitats, as well as in the light of the trade-off among defensive characters.

The fourth chapter tested the geographic mosaic theory of coevolution in 10 populations of the savanna species *Anemopaegma album*. No correlations were found among extrafloral nectaries (and nectar variables), the abundance of visiting ants, herbivory, and plant performance among populations. This pattern was mainly associated with the variation in the assembly of ants encountered in the various populations. Most populations of *A. album* were dominated by assemblages of *Camponotus* ants, except for one that was dominated by *Crematogaster* ants. However, 3 of 10 populations studied presented a high number of plants without ants, decreasing the chances of defense against herbivores by EFNs. The abundance of ants was negatively associated with herbivory, and positively associated with plant performance variables among populations. Out of the 10 populations sampled, five presented an abundance of EFNs that matched the functional traits of ants. Out of these five populations,

only three presented positive leaf production and low herbivory. From these three populations, two presented high abundances of EFNs on the leaves and were dominated by *Camponotus* ants (i.e., bigger in size, but with a low recruiting capacity). The third population presented on average the smallest abundance of EFNs on the leaves; it also presented the highest number of ants per plant (and the highest frequency), which generally were *Crematogaster* ants (smaller in size but with greater recruiting capacity). Because these ants are smaller in size, they used nearly all isolated EFNs encountered over the plant's surface. Neither the abundance of EFNs, the abundance of ants, and the assemblage of herbivores were structured spatially, corroborating the geographic mosaic hypothesis for the ant-plant-herbivore interactions in *A. album.* In this context, the three populations with "matched" ant-plant interactions were considered 'hot-spots' of interactions, in which the populations reached the highest values of plant performance, while the others were considered 'cold-spots'. The majority of 'cold spot' populations were explained by a lack of sufficient ants to protect the plants effectively.

Introdução Geral

Plantas e herbívoros compreendem grande parte dos organismos sobre a Terra. Diversas teorias foram desenvolvidas para tentar explicar as relações encontradas entre esses organismos. Em particular, a teoria de coevolução de plantas e herbívoros (Ehrlich e Raven, 1964) e a teoria de defesa das plantas (Rhoades e Cates, 1976; Feeny, 1976) assumem que as características das plantas (p. ex., químicas, físicas) estão associadas à diminuição do dano causado por herbívoros. Nos trópicos, a seleção recíproca entre plantas e herbívoros promoveu uma maior especialização nessas interações, dentre as quais as plantas sofrem altas taxas de herbivoria e consequentemente, possuem um maior investimento e diversidade de defesas, quando comparadas às plantas das regiões temperadas (Coley e Aide, 1991). Independentemente do sistema em que essas interações acontecem, acredita-se que nem todas as defesas das plantas sejam fisiologicamente compatíveis (Coley e Aide, 1991), sendo algumas delas redundantes (Agrawal, 2007). Portanto, é possível que a seleção exercida pelos herbívoros sobre as plantas seja direcionada a diferentes síndromes de defesa (p. ex., Agrawal e Fishbein, 2006), na qual diferentes espécies apresentam caracteres distintos distribuídos dentro de um contínuo de escape/defesa frente aos herbívoros (Kursar e Coley, 2003).

Neste contexto, um padrão defensivo comum estaria relacionado à idade das folhas, com plantas aumentando a dureza foliar após a expansão completa das folhas e quase não sofrendo danos por herbívoros após esse período (Coley e Kursar, 1996; Kursar e Coley, 2003; Coley et al., 2005). Assim, as síndromes de defesa das plantas estariam associadas à vulnerabilidade das folhas jovens em duas estratégias distintas: algumas espécies de plantas teriam folhas muito bem defendidas quimicamente desde o início de seu desenvolvimento, com uma taxa de expansão foliar lenta; outras espécies teriam uma quantidade menor de defesas químicas e uma taxa de expansão foliar rápida, diminuindo o tempo de exposição dessas folhas jovens aos herbívoros (Kursar e Coley, 2003). No entanto, essas duas estratégias

de escape/defesa não abarcam a quantidade de caracteres reconhecidamente responsáveis pela defesa dos tecidos vegetais. Assim, alguns autores consideraram as síndromes de defesa diferentemente das estratégias de escape e defesa das plantas. Um exemplo pode ser observado em espécies de *Asclepias* (Asclepiadaceae), nas quais três síndromes distintas de defesa foram estabelecidas num estudo que combinou informações ecológicas e filogenéticas do grupo: (1) tolerância/escape, (2) qualidade nutricional baixa, e (3) alta qualidade nutricional e alta defesa direta (Agrawal e Fishbein, 2006).

Existem também trabalhos focados em desvendar o papel funcional de um ou poucos caracteres, dado que alguns deles poderiam ter uma importância maior na defesa contra os herbívoros em espécies particulares. Por exemplo, estruturas morfológicas externas das plantas são as primeiras a entrarem em contato com os herbívoros e poderiam aumentar inicialmente a resistência foliar do tecido vegetal. Em especial, os tricomas estão distribuídos sobre a superfície das plantas e possuem morfologia extremamente diversa (p. ex., uni- a multicelulares, peltados ou ramificados), podendo ser glandulares ou não, variando também a sua densidade e posição nos órgãos vegetais (Levin, 1973). Várias funções são conhecidas para os tricomas (sumarizados em Wagner et al., 2004), dentre elas: (1) redução da oviposição por herbívoros adultos (Coley e Barone, 2001); (2) aumento da resistência foliar, atuando como barreira física contra a herbivoria (Coley e Barone, 2001) e; (3) aumento na tolerância contra seca e raios ultravioletas (Espigares e Peco, 1995). Alguns tricomas glandulares ainda podem assumir papéis diferenciados nas plantas, como por exemplo os tricomas secretores de néctar (um tipo particular de nectário extrafloral; Elias 1983). Funcionalmente, a disponibilização de recursos através da solução acucarada (néctar) produzida pelos nectários atrai insetos, principalmente formigas, que por sua vez defendem as plantas contra os herbívoros (Heil e McKey, 2003). Estas estruturas estão relacionadas com um tipo de defesa indireta frente aos herbívoros, dada a necessidade da presença das formigas para a sua efetividade. Essas estruturas secretoras podem variar na quantidade de substância que secretam, no período em que estão ativas, e no grau de vascularização das mesmas (Elias, 1983).

A seleção natural é o processo microevolutivo responsável por mudanças adaptativas nas populações (Silvertown e Doust, 1993). Acredita-se que esse processo favoreça indivíduos que possuam caracteres tais como tricomas e nectários extraflorais quando esses apresentam variação genética aditiva (herdabilidade), e quando herbívoros selecionam indivíduos fenotipicamente/genotipicamente distintos (Levin, 1973; Heil e McKey, 2003). Dessa forma, quando existe diferença no sucesso reprodutivo associado à presença ou ausência de um determinado gene, a seleção natural é capaz de operar sobre esse gene (Falconer e Mackay, 1996). Neste contexto, três condições são necessárias para que a seleção natural atue: (1) variação do caráter entre indivíduos de uma população (polimorfismo); (2) diferença no desempenho entre os indivíduos que apresentem variação dessa característica e; (3) hereditariedade das diferenças da característica entre os indivíduos (Silvertown e Doust, 1993).

No entanto, no caso particular das interações planta-herbívoro, espera-se que os caracteres de defesa (p. ex., tricomas) das plantas sejam selecionadas somente quando os benefícios de defesa superem os custos de sua produção (Heil e Mckey, 2003; Coley e Barone, 2001). Desta forma, tais estruturas de defesa estariam concentradas sobre partes vegetais mais vulneráveis ou partes em que a perda de tecido vegetal fosse mais custosa à planta (Heil e McKey, 2003). No caso particular das interações mutualísticas planta-formiga (p. ex., Janzen, 1966), uma parte do custo da interação estaria associado a produção da recompensa energética oferecida às formigas por parte da planta (geralmente néctar), enquanto os benefícios estariam relacionados aos serviços prestados pelas formigas sobre as plantas, na defesa frente aos herbívoros, a diminuição do dano foliar (Heil e McKey, 2003). Em geral, as formigas tendem a diminuir a herbivoria e os herbívoros sobre as plantas, e aumentar a performance das plantas (Chamberlain e Holland, 2009; Rosumek et al., 2009; Trager et al. 2010).

Mais recentemente, os caracteres de defesa das plantas e o processo de herbivoria têm incorporado também análises da variação fenotípica das plantas no contexto macroevolutivo (Agrawal, 2007), de forma a considerar as relações de parentesco entre as espécies estudadas (p. ex., Fine et al., 2004; Fine et al., 2006). Dessa forma torna-se possível visualizar o padrão evolutivo dos caracteres nas filogenias, e subsequentemente inferir os diversos processos

evolutivos, tais como seleção natural e adaptação (Larson e Losos, 1996) e/ou a evolução neutra dos caracteres (Blomberg et al., 2003). Esses métodos avaliam a divergência fenotípica ao longo do tempo à luz da filogenia (Diniz-Filho, 2000). Quando dispomos de filogenias com informações sobre o comprimento dos ramos, é ainda possível mapear os caracteres de interesse sobre essa filogenia e assim reconstruir os estados ancestrais dos caracteres de interesse. Estas análises permitem uma avaliação da direção e ordem das mudanças morfológicas (Diniz-Filho, 2000), e o teste de hipótese de correlação evolutiva entre esses caracteres (Larson e Losos, 1996). Por exemplo, é possível o teste de hipóteses de "trade-off" entre caracteres (hipótese de correlação negativa), quando tais caracteres são tidos como incompatíveis ou redundantes (Agrawal, 2007); ou ainda a potencial ligação genética entre caracteres (hipóteses de correlação positiva) (Larson e Losos, 1996).

Além disso, esta abordagem permite ainda relacionar as mudanças morfológicas ocorridas dentro de grupos de plantas particulares e as mudanças de regimes de seleção dessas plantas (Larson e Losos, 1996). Determinados padrões podem ser utilizados como evidência de adaptação ou exaptação de determinado estado do caráter a determinado ambiente ou regime de seleção (Larson e Losos, 1996). A reconstrução explícita da evolução de caracteres evidencia o número de vezes que cada estado de caráter surgiu independentemente (Cunningham et al., 1998), e a associação dessas múltiplas evoluções com mudanças em outros caracteres, ou regimes seletivos das plantas. Apesar dos resultados provenientes de análises filogenéticas comparadas serem de suma importância para um melhor entendimento da evolução dos caracteres de defesa das plantas, e para o teste de hipóteses adaptativas, essa abordagem é correlacional, e somente por meio de dados empíricos torna-se possível corroborar os resultados das análises comparadas (Larson e Losos, 1996; Reznick e Travis, 1996).

Desta forma, dados filogenéticos são importantes, por exemplo, para demonstrar se o caráter evoluiu subsequentemente as pressões seletivas. Por outro lado, dados empíricos são necessários para demonstrar a função biológica atual dos caracteres de defesa, a seleção natural exercida pelos herbívoros, e a vantagem conferida por esse caráter para a ocupação de

um determinado ambiente. Destes aspectos, a seleção natural é a mais difícil de ser demonstrada (Larson e Losos, 1996; Reznick e Travis, 1996). Assim, a primeira condição necessária para o estudo de seleção natural é a existência de padrões de polimorfismo para as características de interesse (ou potenciais polimorfismos na ausência de dados sobre a base genética de tais características). Quanto maior for o polimorfismo, maior será a amplitude de variação desse caráter na população e maior a chance de se detectar seleção se ela estiver ocorrendo (Ruxton e Colegrave, 2003). No entanto, nos casos em que um determinado fenótipo já tenha sido fixado (sobre o genótipo) e não tenhamos mais polimorfismo na população, manipulações experimentais podem recriar o estado alternativo de ausência do caráter. Através desse procedimento é possível quantificar o valor adaptativo de um caráter particular partindo da hipótese de que ele tenha sido fixado por seleção natural (Wade e Kaliz, 1990).

A seleção pode ainda levar a diferentes situações dependendo dos fenótipos que estão sendo favorecidos na população (Brodie et al., 1995). Por exemplo, a seleção pode preservar características da população favorecendo indivíduos que apresentam fenótipos intermediários (seleção estabilizadora). A seleção pode ainda favorecer indivíduos cujas características encontram-se em apenas um dos extremos da distribuição fenotípica (seleção direcional). Por fim, a seleção pode modificar características da população favorecendo indivíduos cujas características encontram-se em ambos os extremos da distribuição fenotípica (seleção disruptiva) (Brodie et al., 1995). No caso particular dos caracteres de defesa, em especial nos tricomas, a seleção direcional (p. ex., Valverde et al., 2001) e estabilizadora (p. ex., Elle et al. 1999) têm sido invocadas para explicar os padrões de variação encontrados em populações naturais.

Além dos diferentes modelos de seleção aplicáveis as características de defesa das plantas, o processo de seleção pode variar entre populações de uma mesma espécie, dado que as espécies de plantas e animais herbívoros dificilmente se sobrepõem em sua distribuição na paisagem (variação das espécies interagindo entre localidades) (Thompson, 1994). Em outras palavras, as interações planta-animal dependeriam de um contexto específico da comunidade

(dependência de contexto; Jones e Callaway, 2007). A Teoria de Coevolução em Mosaico Geográfico incorporou o componente geográfico no estudo das interações planta-animal, reforçando a idéia de que populações diferentes de uma mesma espécie estariam sob diferentes pressões bióticas e abióticas (Thompson, 2005). Dessa forma, as características de defesa das plantas poderiam ser efetivas em determinadas populações, mas não efetivas em outras, ou mesmo desnecessárias em alguns casos (p. ex., na ausência dos herbívoros). Esses padrões seriam dependentes da variação genética das características e do fluxo gênico entre populações, da presença dos herbívoros e outros agentes bióticos relevantes na interação com as plantas, do efeito da interação na resposta adaptativa das plantas (ligação entre os caracteres de defesa e a performance das plantas), dentre outros (Thompson, 1999).

Neste trabalho, procurou-se desvendar os aspectos evolutivos e ecológicos dos tricomas em diferentes escalas temporais e geográficas, enfocando o potencial papel defensivo dessas estruturas na diminuição da herbivoria ou aumento da resistência das plantas. No decorrer do trabalho e de maneira natural deu-se maior ênfase aos tricomas secretores de néctar amplamente associados a visitação de formigas nas espécies de Bignoniaceae, particularmente nas espécies da tribo Bignonieae (*sensu* Lohmann, 2006), dada a ampla variação quantitativa dessas estruturas secretoras dentro e entre espécies em florestas úmidas e nas savanas brasileiras mais secas.

No *capítulo 1* descrevemos os diferentes tipos de tricomas distribuídos nas partes vegetativas de espécies da tribo Bignonieae, bem como descrevemos o padrão macroevolutivo dessas estruturas na tribo. Com isso, procuramos revisar a terminologia empregada para tais estruturas, confrontar o conhecimento anatômico, morfológico e funcional das mesmas, e testar se a similaridade morfológica dos diferentes tipos de tricomas foi decorrente da ancestralidade comum.

No *capitulo 2* testamos o papel defensivo dos tricomas secretores de néctar (nectários extraflorais) em duas espécies de *Anemopaegma* das savanas neotropicais (*Anemopaegma album* e *Anemopaegma scabriusculum*). Testes inicias foram realizados para quantificar o papel dos nectários na atração da assembléia de formigas e experimentos de exclusão das

formigas foram realizados com o objetivo de quantificar o efeito dos nectários (e formigas associadas) no processo de herbivoria, e também na floração e frutificação das plantas. Finalmente foi realizada uma ampla discussão sobre o papel dessas estruturas secretoras, o custo/benefício provido por elas, e a condicionalidade para sua efetividade enquanto defesa. Em especial, duas hipótese foram recuperadas da literatura e discutidas neste capítulo: (1) a hipótese da inércia filogenética, dependente do contexto evolutivo do grupo em que as espécies estão inseridas; (2) e a hipótese de coevolução em mosaico geográfico, que prevê variação nos resultados das interações entre populações, com população defendidas e outras não defendidas pelas formigas.

No capítulo 3 testamos as hipóteses defensivas dos nectários extraflorais e das formigas associadas considerando o maior número de espécies da tribo Bignonieae (Bignoniaceae) no contexto filogenético. Para isso, foram criadas hipóteses sobre o padrão macroevolutivo de variação da abundância de nectários esperado entre espécies em função da mudança de habitat (floresta – savana), e do surgimento de novas características morfológicas (outros tipos de tricomas). Conjuntamente, amostramos as interações formiga-planta em espécies de florestas e savanna da tribo Bignonieae, considerando a abundância de formigas sobre as plantas ("recrutamento") e o número de nectários ativos secretando néctar. Correlações foram realizadas entre a abundância de nectários e a abundância de formigas visitantes, controlando para o efeito da filogenia. Um modelo nulo descrevendo a evolução neutra dos caracteres (evolução browniana) também foi utilizado para confrontar a variação dos nectários em função da filogenia no grupo, bem como para detectar se a evolução desses caracteres desviavam do modelo neutro. Finalmente foram realizados testes da hipóteses relacionando a mudança de habitat (floresta-savanna) e o surgimento de novos caracteres (tricomas em geral) com modificações nas interações planta-formiga neste grupo de plantas em particular. Ambas hipóteses têm grande potencial de serem testadas em outros grupos de plantas dado que padrões semelhantes de ocupação de habitat e variação morfológica já foram descritos na literatura.

No capítulo 4 testamos a hipótese de mosaico geográfico das interações plantaformiga mediadas pelos nectários extraflorais (segundo a Teoria de Coevolução em Mosaico
Geográfico; Thompson, 1994, 2005). Nesse contexto, amostramos 10 populações (30
indivíduos cada) da espécie Anemopaegma album, um arbusto das savannas brasileiras. Além
disso, quantificamos a abundância dos nectários, a concentração de açúcar e volume de néctar,
a assembléia de formigas e herbívoros, a herbivoria foliar, e as variáveis que descrevem a
performance das plantas (produção foliar entre dois momentos do tempo, e número de
plântulas crescendo ao redor do adulto amostrado) em cada uma das populações. Finalmente
exploramos os padrões de correlação entre essas variáveis de acordo com as hipóteses
adaptativas para os nectários entre as populações. Em uma abordagem correlacional,
descrevemos potenciais "hot-spots" e "cold-spots" das interações, os primeiros indícios de que
tais interações podem ser vantajosas em algumas populações, mas ineficazes (ou até mesmo
ausentes) em outras.

Referências

- Agrawal A.A. e M. Fishbein. 2006. Plant Defense Syndromes. *Ecology* 87: S132–S149.
- Agrawal A.A. 2007. Macroevolution of plant defense strategies. *Trends in Ecology and Evolution* 22: 103-109.
- Blomberg S.P., T. Garland, e A.R. Ives. 2003. Testing for phylogenetic signal in comparative data: behavioral traits are more labile. *Evolution* 57: 717-745.
- Brodie III E.D, A.J. Moore e F.J. Janzen. 1995. Visualizing and quantifying natural selection. TREE 10: 313-318.
- Chamberlain S. e J.N. Holland. 2009. Quantitative synthesis of context dependency in antplant protection mutualisms. *Ecology* 90: 2384-92.
- Coley P.D. e T.M. Aide. 1991. Comparison of herbivory and plant defenses in temperate and tropical broad-leaved forests. p. 25-49 In: P.W. Price, T.M. Lewinsohn, G.W. Fernandes e W.W. Benson (eds.). *Plant-Animal Interactions: Evolutionary Ecology in Tropical and Temperate Regions*. John Wiley & Sons, New York, USA.
- Coley P.D. e T.A. Kursar, 1996. Anti-herbivore defenses of young tropical leaves: physiological constraints and ecological trade-offs. p. 305-336. In: S.S. Mulkey, R.L. Chazdon e A.P. Smith (eds.), *Tropical Forest Plant Ecophysiology*. Chapman & Hall, ITP, USA.
- Coley P.D. e J.A. Barone. 2001. Ecology of defenses. Encyclopedia of Biodiversity, 2: 11-21.
- Coley P.D., J. Lokvam, K. Rudolph, K. Bromberg, T.E. Sackett, L. Wright, T. Brenes-Arguedas, D. Dvorett, S. Ring, A. Clark, C. Baptiste, R.T. Pennington e T.A. Kursar.
 2005. Divergent defensive strategies of young leaves in two species of *Inga. Ecology* 86: 2633–2643.
- Cunningham C.W., K.E. Omland e T.H. Oakley. 1998. Reconstructing ancestral character states: a critical reappraisal. *Trends in Ecology and Evolution*. 13: 361-366.

- Diniz-Filho J.A.F. 2000. *Métodos Filogenéticos Comparativos*. Ribeirão Preto: Holos Editora 120 p.
- Ehrlich P.R. e P.H. Raven. 1964. Butterflies and plants: a study in coevolution. *Evolution*. 18: 586-608.
- Elias T.S. 1983. Extrafloral nectaries: their structure and distribution. p. 174-203, In: B. Bentley & E. Thomas (eds.) *The biology of nectaries*. Columbia University Press, New York, USA.
- Elle E., N.M. van Dam, e J.D. Hare. 1999. Cost of glandular trichomes, a "resistance" character in *Datura wrightii* Regel (Solanaceae). *Evolution* 53: 22-35.
- Espigares T. e B. Peco. 1995. Mediterranean annual pasture dynamics: impact of autumn drought. *Journal of Ecology* 83: 135-142.
- Feeny P. 1976. Defensive ecology of the cruciferae. *Annals of Missouri Botanical Garden*. 64: 221-234.
- Fine P.V.A., I. Mesones e P.D. Coley 2004. Herbivores promote habitat specialization by trees in amazonian forests. *Science* 305: 663-665.
- Fine P.V.A., Z.J. Miller, I. Mesones, S. Irazuzta, H.M. Appel, M.H.H. Stevens, I. Saaksjarvi, J.C. Schultz e P.D. Coley. 2006. The growth-defense trade-off and habitat specialization by plants in Amazonian Forests. *Ecology* 87: S150-S162.
- Heil M. e D. Mckey. 2003. Protective ant-plant interactions as model systems in ecological and evolutionary research. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 34: 425–53.
- Huey R.B. e A.F. Bennett, 1987. Phylogenetics of co-adaptation: preferred temperatures versus optimal performance temperature of lizards. *Evolution* 41: 1098-1115.
- Janzen D.H. 1966. Coevolution of mutualism between ants and acacias in Central America. *Evolution* 20: 249-275.
- Jones C.G. e R.M. Callaway. 2007. The third party. *Journal of Vegetation Science* 18: 771-776.

- Kursar T.A. e P.D. Coley. 2003. Convergence in defense syndromes of young leaves in tropical rainforests *Biochemical Systematics and Ecology* 31: 929–949.
- Larson A. e J.B. Losos. 1996. Phylogenetic systematics of adaptation. p. 187-220. In: M.R. Rose e G.V. Lauder (eds.) *Adaptation*. Academic Press, California, USA.
- Levin D.A. 1973. The role of trichomes in plant defense. *The Quarterly Review of Biology* 48: 3-15.
- Lohman L.G. 2006. Untangling the phylogeny of neotropical lianas (Bignoniaeae, Bignoniaeae). *American Journal of Botany* 93: 304-318.
- Reznick D. e J. Travis. 1996. *The empirical study of adaptation in natural populations*. p. 243-290. In: M.R. Rose e G.V. Lauder (eds.) *Adaptation*. Academic Press, California, USA.
- Rhoades D.F. e R.G. Cates. 1976. Toward a general theory of plant antiherbivore chemistry.

 *Recent Advances in Phytochemistry. 10: 168-213.
- Rosumek F.B., F.A.O. Silveira, F. de S. Neves, N.P. de U. Barbosa, L. Diniz, Y. Oki, F. Pezzini, G.W. Fernandes e T. Cornelissen. 2009. Ants on plants: a meta-analysis of the role of ants as plant biotic defenses. *Oecologia* 160: 537-549.
- Ruxton G.D. e N. Colegrave. 2003. Experimental design for the life sciences. Oxford University Press, New York, USA. 114 p.
- Silverstown J. e J. Lovett-Doust. 1993. *Introduction to plant population biology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, USA. 210 p.
- Thompson J.N. 1994. *The coevolutionary process*. The University of Chicago Press, Chicago and London, USA. 376 p.
- Thompson J.N. 1999. Specific hypotheses on the geographic mosaic of coevolution. *The American Naturalist* 153: 1-14.
- Thompson J.N. 2005. *The geographic mosaic of coevolution*. The University of Chicago Press, Chicago and London, USA. 400 p.

- Trager M.D., S. Bhotika, J.A. Hostetler, G.V. Andrade, M.A. Rodriguez-Cabal, C.S. McKeon, C.W. Osenberg, e B.M. Bolker. 2010. Benefits for plants in ant-plant protective mutualisms: a meta-analysis. *PLoS ONE* 5: 1-9.
- Valverde P.L., J. Fornoni e J. Nunez-Farfan. 2001. Defensive role of leaf trichomes in resistance to herbivorous insects in *Datura stramonium*. *Journal of Evolutionary*. *Biology*. 14: 424-432.
- Wade M.J. e S. Kalisz. 1990. The causes of natural selection. Evolution 44: 1947-1955.
- Wagner G.J., E. Wang e R.W. Shepherd. 2004. New approaches for studying and exploiting an old protuberance, the plant trichome. *Annals of Botany* 93: 3-11.

Considerações finais e perspectivas

Neste trabalho procuramos explorar diversos aspectos da evolução e ecologia dos tricomas distribuídos na superfícies das plantas nas partes vegetativas de espécies da tribo Bignonieae (Bignoniaceae).

Quatro morfotipos de tricomas foram identificados nas 105 espécies da tribo Bignonieae amostradas: tricomas não-glandulares, glandular peltados, glandular estipitados e glandular pateliforme/cupulares. O detalhamento morfológico e análises filogenéticas comparativas revelaram que a maior parte destes tricomas já estavam presentes no ancestral da tribo, exceto os tricoma glandular estipitado o qual evoluiu posteriormente. Tais resultados favoreceram o estabelecimento de uma terminologia unificada para os diversos tipos de tricomas, de forma a facilitar estudos funcionais, ecológicos, e evolutivos dos tricomas na tribo Bignonieae.

Os tricomas pateliformes ou nectários extraflorais de duas espécies de *Anemopaegma* (*A. album* e *A. scabriusculum*) atraíram formigas nas savanas do norte de Minas Gerais, mas não foram efetivos no aumento da resistência foliar frente aos herbívoros. Neste caso em particular, os herbívoros foram muito danosos as plantas e pareceram especializados nas espécies de *Anemopaegma* (observações de 2 anos). Dentro deste cenário, é possível que a invasão dos ancestrais de *Anemopaegma* das florestas úmidas para savanas tenham modificado as interações formiga-planta-herbívoro, de forma que o balanço entre o custo-benefício desses nectários tivesse sido alterado, tornando tais estruturas geralmente 'ineficientes' em áreas de savanas.

O fato de múltiplas 'invasões' independentes de plantas das florestas úmidas terem ocorrido para as savanas durante a história de diversificação das espécies de Bignonieae favoreceu o teste da hipótese de modificação do número de tricomas pateliformes (nectários extraflorais) em paralelo às transições de ambientes florestais para savanas, e o teste de hipóteses de "trade-off" entre os nectários e o surgimento de outros tipos de tricomas. De uma forma geral, quanto maior o número de nectários, maior o número de formigas encontradas visitando as plantas. Além disso, a evolução dessas estruturas desviou do modelo neutro de evolução (movimento browniano), com dois fatores principais explicando esse desvio: a 'ocupação/invasão' das plantas de floresta para as savanas, e o surgimento de tricomas glandulares adesivos, os quais tiveram um efeito semelhante na diminuição do número de nectários nas plantas. Esses resultados sugerem que mudanças de habitat e o surgimento de novos tipos de tricomas podem ter "quebrado" interações que foram efetivas no aumento da resistência das plantas no passado.

Populações distintas de *Anemopaegma album* distribuídas do norte de Minas Gerais até a região central da Bahia foram muito variáveis em termos das interações formiga-planta-

herbívoro e das características dos nectários extraflorais entre as 10 populações amostradas. Não foram encontradas correlações entre os descritores dos nectários, as formigas, a herbivoria e as variáveis de performance das plantas entre populações. Por outro lado, a abundância de formigas esteve negativamente relacionada com a herbivoria, e positivamente relacionada com as variáveis de performance. Nem a abundância de nectários, nem as formigas ou mesmo a herbivoria estiveram estruturados espacialmente. Ambos resultados corroboram a hipótese de mosaico geográfico entre formigas e plantas. Cinco populações das dez amostradas tiveram os nectários acoplados (do inglês, "matched") com as formigas visitantes. Destas cinco populações, somente três tiveram uma produção positiva de folhas e baixa herbivoria. Duas dessas populações tiveram alta abundância de nectários nas folhas e foram dominadas por formigas do gênero Camponotus (maiores em tamanho, e com baixa capacidade de recrutamento). Já a terceira população apresentou a menor abundância de nectários nas folhas, e o maior número de formigas por planta (e maior frequência), as quais pertenciam predominantemente ao gênero Crematogaster (menores em tamanho mas com grande capacidade de recrutamento). Neste contexto, as três populações cujas interações formiga-planta eram acopladas e cujas populações atingiram os valores mais altos das variáveis de performance foram consideradas "hot-spots" das interações, enquanto as demais foram consideradas "cold-spots".

Todos esses resultados sugerem que as interações formiga-planta, e o papel funcional dos nectários extraflorais, tenham sido efetivos por diversas vezes nas florestas mais úmidas no passado (e também hoje), mas pouco efetivos (ou raramente) nas savanas deste grupo de plantas em particular. É provável que o ancestral da tribo Bignonieae tivesse um número baixo de nectários, os quais não apresentavam distribuição agregada e estavam distribuídos sobre os folíolos exclusivamente (Capítulo 1). A presença de apenas poucos nectários dispersos no limbo foliar geralmente leva a uma baixa atração de formigas no ambiente florestal (Capítulo 3), e provavelmente não conferiram um papel defensivo no ancestral da tribo Bignonieae. No entanto, essa estrutura inicial provavelmente representou uma préadaptação para uma morfologia subsequente no grupo que realmente tornou-se efetiva contra a herbivoria no ambiente florestal, nas regiões de agregação de nectários nos profilos da gema axilar, na região interpeciolar dos ramos, e na base da face abaxial dos folíolos (mais raramente nos pecíolos e peciólulos na tribo Bignonieae). No entanto, a falta de testes experimentais sobre o papel defensivo dos nectários extraflorais e das formigas visitantes em espécies de plantas florestais da tribo Bignonieae ainda deixa essa questão em aberto no ambiente florestal mais úmido.

Além disso, as interações formiga-planta das florestas foram dominadas (> 50% das interações por espécie de Bignonieae) essencialmente por formigas do gênero *Crematogaster* (Capítulo 3). Coincidentemente, na abordagem "entre populações" da espécie *Anemopaegma*

album de savana (Capítulo 4), a população com maiores valores de performance e menor herbivoria foi a população em que as interações formiga-planta foram dominadas também por formigas do gênero *Crematogaster* (população 'Mirangaba'). Ambos resultados levantam a questão sobre o papel particular destas formigas nas interações com as plantas da tribo Bignoineae. Testes experimentais sobre o efeito particular das *Crematogaster* sobre a herbivoria, separadamente das demais formigas, contribuiriam com dados importantes para o esclarecimento do aspecto coincidente revelado em nossos resultados.

Todas essas novas questões tornaram o sistema formiga-planta-herbívoro mediado pelos nectários extraflorais (tricomas peteliformes/cupulares glandulares) em Bignoniaceae, e em especial em Bignonieae, extremamente interessantes para os estudos futuros. O conjunto de informações levantados nessa tese, torna possível a formulação de experimentos e perguntas mais refinadas dentro desse sistema tropical em particular. Espera-se assim, que essa tese seja somente o primeiro passo no estudo evolutivo das interações formiga-planta em Bignoniaceae como um todo, e seu papel frente aos herbívoros, e outros processos relevantes no ciclo de vida das plantas.