UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA

**Interação formiga-planta: impacto da variação na oferta de néctar extrafloral
sobre o forrageamento de formigas**

Eduardo Calixto Soares

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como
parte das exigências para a obtenção do título de
Mestre em Ciências, Área: Entomologia.

Ribeirão Preto, SP

2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA

**Interação formiga-planta: impacto da variação na oferta de néctar extrafloral
sobre o forrageamento de formigas**

“Versão Corrigida”

Eduardo Calixto Soares

Orientador: **Prof. Dr. Kleber Del Claro**

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como
parte das exigências para a obtenção do título de
Mestre em Ciências, Área: Entomologia.

Ribeirão Preto, SP

2015

Nome: **Eduardo Calixto Soares**

Título: **Interação formiga-planta: impacto da variação na oferta de néctar extrafloral sobre o forrageamento de formigas**

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: Entomologia.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Rodrigo Augusto Santinelo Pereira Instituição: Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Vanessa Stefani Sul Moreira Instituição: Universidade Federal de Uberlândia

Aos meus pais, Rubens e Hilda, e a minha
namorada, Melina, os quais sempre
estiveram ao meu lado.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

à Deus, por me fornecer forças e coragem para enfrentar todos os obstáculos e por ter iluminado meu caminho para a conclusão de mais uma etapa de minha vida;

aos meus pais, Rubens e Hilda, e ao meu irmão, Jean Carlos, por todos os ensinamentos, por todo o carinho, o amor e a dedicação que sempre tiveram comigo. Obrigado por serem exemplos de vida e serem o meu maior orgulho;

à minha família, que sempre me apoiou, me ensinou e acreditou mim;

à minha namorada Melina, por confiar e acreditar em mim; por enfrentar ao meu lado os momentos difíceis e cansativos; obrigado por todo carinho, amor, lealdade e companheirismo. Agradeço com enorme satisfação e sinceridade por tudo que me proporcionou e me proporciona;

ao meu sogro e sogra, Nivaldo e Cláudia, por acreditarem em mim; pelo apoio frente aos desafios e dificuldades encontradas e por todo o carinho que me proporcionam. Agradeço imensamente por estar ao vosso lado.

ao meu orientador e minha coorientadora, Kleber Del Claro e Denise Lange, respectivamente, por todos os ensinamentos, pela paciência e por nortear meu caminho tanto academicamente como pessoalmente durante todos esses anos de convívio.

à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro durante o período de desenvolvimento da dissertação.

por fim, com muito carinho e sinceridade, aos meus familiares, amigos, professores; à Universidade de São Paulo; e a todos que contribuíram direta ou indiretamente para que esse trabalho fosse realizado.

A todos vocês, muito obrigado.

**“Ah... mas quem sou eu senão uma formiguinha das menores,
que anda pela Terra cumprindo sua obrigação!”**

Chico Xavier

Sumário

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	10
1 INTRODUÇÃO GERAL	12
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15

CAPÍTULO 1

Resumo.....	25
Abstract.....	25
1 Introduction.....	26
2 Material and method.....	27
2.1 Study site and plant species.....	27
2.2 Defense and leaf herbivory.....	27
2.3 Data analysis.....	28
3 Results	28
4 Discussion.....	30
5 Acknowledgements	33
6 References.....	33

CAPÍTULO 2

1 Introdução.....	40
2 Material e Métodos.....	42
3 Resultados.....	46
3.1 Herbivoria Foliar.....	46
3.2 Herbivoria Floral.....	50
3.3 Herbivoria Foliar versus Herbivoria Floral.....	54
4 Discussão.....	56
4.1 Herbivoria Foliar e Floral.....	56
4.2 Herbivoria Foliar versus Herbivoria Floral.....	61

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
---	----

2 CONCLUSÃO GERAL	72
--------------------------------	----

RESUMO

CALIXTO, E. S. **Interação formiga-planta: impacto da variação na oferta de néctar extrafloral sobre o forrageamento de formigas.** Dissertação – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2015, 73 folhas.

As plantas, produtores da base das cadeias tróficas, apresentam diversos tipos de defesas contra a ação de consumidores, os herbívoros, podendo ser defesas físicas, químicas e bióticas. Nas defesas bióticas, plantas fornecem recursos alimentares (*e.g.* néctar extrafloral) e/ou moradia para predadores que em troca podem fornecer proteção contra herbívoros. Assim, a partir de comportamentos agressivos e/ou de patrulha, formigas são consideradas os principais protetores de plantas. Nessa perspectiva, a presente dissertação buscou investigar a influência que o néctar extrafloral tem sob a interação formiga-planta em uma área de Cerrado. O estudo foi realizado na Reserva Ecológica do Clube Caça e Pesca Itororó de Uberlândia, no município de Uberlândia, MG, em uma área com fitofisionomia de cerrado sentido restrito. A espécie de planta utilizada neste estudo foi *Qualea multiflora* (Vochysiaceae), uma das espécies mais abundantes do Cerrado, a qual apresenta nectários extraflorais (NEFs) na base do pecíolo foliar e nas inflorescências. Nossas hipóteses principais foram: a) que formigas visitantes dos NEFs de *Q. multiflora* impactam positivamente a planta, reduzindo a ação de herbívoros; b) que essas interações formigas-plantas são modificadas ao longo do desenvolvimento fenológico das folhas das plantas; c) que diferentes níveis de herbivoria nas plantas produzem também diferentes reações nas formigas visitantes; e d) que diferentes estruturas das plantas apresentam diferentes níveis de defesas. Os resultados demonstrados no Capítulo 1 comprovam que a herbivoria foliar em *Q. multiflora* foi baixa e similar nos diferentes estágios de desenvolvimento da folha, mostrando que as defesas expressas pela planta são eficientes. Das três defesas foliares avaliadas durante o desenvolvimento foliar, observou-se que a densidade de tricomas apresenta pico de efetividade no início do desenvolvimento, a defesa biótica (produtividade dos NEFs) apresenta pico de efetividade no período intermediário do desenvolvimento, e a dureza foliar apresenta pico de efetividade no período em que a folha já está adulta. Esses resultados comprovam a eficiência da variação temporal nas defesas foliares de *Q. multiflora*, o que interfere diretamente na interação formiga-planta. No Capítulo 2, foi mostrado que NEFs localizados em inflorescências produzem néctar mais volumoso e energético que atrai maior quantidade de formigas comparado ao néctar produzido pelos NEFs foliares. A produtividade e a atratividade dos NEFs, assim como o forrageamento de formigas, também foram afetados por variações na herbivoria (simulada experimentalmente). Esses resultados demonstram que *Q. multiflora* sincroniza suas defesas foliares ao longo do tempo garantindo a proteção contra herbívoros e que essas defesas

(como evidenciado para defesa biótica) podem ser alteradas de acordo com o valor e probabilidade de ataque de suas estruturas.

Palavras-chave: Simulação de herbivoria, Defesa Induzida, Teoria da Defesa Ótima, *Qualea multiflora*.

ABSTRACT

Plants, producers of food chains, have different types of defenses against action of consumers, herbivores, which can be physical, chemical and biotic defenses. In biotic defenses, plants provide food resources (*e.g.* extrafloral nectar) and/or shelter for predators, which in turn may provide protection against herbivores. Thus, from patrol and/or aggressive behavior, ants are considered main plants protectors. From this perspective, the present work aimed to investigate the influence that extrafloral nectar has under ant-plant interaction in an area of Cerrado. The study was conducted in Reserva Ecológica do Clube Caça e Pesca Itororó de Uberlândia, in Uberlândia, MG, in an area with cerrado stricto sensu vegetation. The plant species used was *Qualea multiflora* (Vochysiaceae), one of the most abundant species of Cerrado, which has extrafloral nectaries (EFNs) at the base of leaf petiole and in inflorescences. Our main assumptions were: a) EFNs visitors ants of *Q. multiflora* positively impact the plant reducing the herbivore action; b) these ants-plants interactions are modified along the phenological development of plant leaves; c) different herbivory levels in plants produce different reactions in visitors ants; and d) different plant structures have different defenses levels. Results presented in Chapter 1 show that foliar herbivore in *Q. multiflora* was low and similar to different stages of leaf development, showing that expressed plant defenses are effective. Of the three foliar defenses evaluated during leaf development, it was observed that density of trichomes presents effectiveness peak in early development, biotic defense (EFNs productivity) in intermediated period of development and leaf toughness in the period in which the leaf is adult. These results show the efficacy of temporal variation in foliar defenses in *Q. multiflora*, which directly affects ant-plant interaction. In Chapter 2, it was shown that EFNs located in inflorescences produce nectar more quantitative and qualitative, which attract large amount of ants, than EFNs located in leaves. EFNs productivity and attractiveness, as well as ants foraging, were also influenced by herbivory variation (experimentally simulated). These results show that *Q. multiflora* synchronizes its leaf defenses over time ensuring protection against herbivores and that these defenses (as evidenced for biotic defense) can be changed according to value and attack probability of their structures.

Keywords: Herbivory simulation, Induced defenses, Optimal Defense Theory, *Qualea multiflora*.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figure 1. Characteristics of *Qualea multiflora* (Vochysiaceae) leaves according to five distinct developmental stages (foliar ages), from initial expansion (1) to full expansion and maximum toughness (5). (a) the density of trichomes (nested ANOVA test with Tukey's post-hoc test); (b) foliar toughness (t-paired test); and (c) percentage of leaves with active EFNs (χ^2 test – Yates correction). The symbol ** (in “a”, “b” and “c”) and the distinct letters (in “a” and “c”) indicate a significant statistical difference ($p < 0.05$). The bars in “a” and “b” are mean $\pm$ SE ($n = 20$). 29

Figure 2. Different anti-herbivory tactics can be useful to plants under different selection pressures. *Qualea multiflora* (Vochysiaceae) trees resprout while in flush, producing large numbers of soft young leaves of very small size fully covered by trichomes. In the initial expansion phase, the leaves shed trichomes and attract herbivores. The plant then quickly activates its EFNs, attracting predators like ants and spiders that defend the plant against herbivores. In the final stage of leaf development, the EFNs become sclerotized, stopping nectar production, and the plant switches to investing in toughness in order to protect its leaves. 32

CAPÍTULO 2

Figura 1. Nectários extraflorais ativos na folha (a e c) e na base da inflorescência (b); e (d) nectários extraflorais necrosados (setas em vermelho) em *Qualea multiflora* (Vochysiaceae). Fotos: Lange, D. e Calixto, E.S. 33

Figura 2. Volume de néctar foliar em *Qualea multiflora* (Vochysiaceae) nos três diferentes grupos de plantas (sem herbivoria, plantas com 10%, e plantas com 40% de simulação de herbivoria). As barras representam os valores médios com o desvio padrão. $F_{[2,44]}=12,242$; $p<0,001$. Letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. ^a – Os dados estão representados por Log (x+1). 33

Figura 3. Volume de néctar foliar em *Qualea multiflora* (Vochysiaceae) nas plantas do grupo (a) sem herbivoria, (b) 10% e (c) 40% de simulação de herbivoria, após o momento do dano. As barras representam os valores de mediana e interquartil. Sem herbivoria (Friedman_[5,89]=48,30; $p<0,001$; Fig. 3a), 10% de simulação de herbivoria (Friedman_[5,89]=35,50; $p<0,001$; Fig. 3b), e 40% de simulação de herbivoria (Friedman_[5,89]=48,93; $p<0,001$; Fig. 3c). Letras diferentes diferem entre si pelo teste de Comparação Múltipla de Friedman ao nível de 5% de probabilidade. 33

Figura 4. Calorias presentes no néctar extrafloral em *Qualea multiflora* (Vochysiaceae) nos três diferentes grupos de plantas (sem herbivoria, plantas com 10% e plantas com 40% de simulação de herbivoria). As barras representam os valores médios com o desvio padrão. $F_{[2,44]}=16,39$; $p<0,001$. Letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. ^a – Os dados estão representados por Log (x+1). 33

Figura 5. Calorias presentes no néctar foliar em *Qualea multiflora* (Vochysiaceae) em todos os horários de coleta nas plantas do grupo (a) sem herbivoria (sem manipulação experimental), (b) 10% e (c) 40% de simulação de herbivoria, após o momento do dano. As barras representam os valores de média e desvio padrão. 33

Figura 6. Abundância de formigas em *Qualea multiflora* (Vochysiaceae) nos três diferentes grupos de plantas (sem herbivoria, plantas com 10% e plantas com 40% de simulação de herbivoria). $H=15,09$; $GL=2$; $p<0,001$. As barras representam os valores de mediana e interquartil. Letras diferentes diferem entre si pelo teste de Dunn ao nível de 5% de probabilidade. 33

Figura 7. Abundância de formigas em *Qualea multiflora* (Vochysiaceae) nas plantas do grupo (a) sem herbivoria, (b) 10% (Friedman_[6,104]=21,99; $p<0,001$) e (c) 40% de simulação de herbivoria

(Friedman_[6,104]=20,81; $p<0,01$), após o momento do dano. As barras representam os valores de mediana e interquartil. Letras diferentes diferem entre si pelo teste de Comparação Múltipla de Friedman ao nível de 5% de probabilidade.33

Figura 8. Abundância das espécies de formigas encontradas em plantas de *Qualea multiflora* (Vochysiaceae) do grupo (a) sem herbivoria, (b) 10% e (c) 40% de simulação de herbivoria, após o momento da simulação.33

Figura 9. Volume de néctar extrafloral das inflorescências de *Qualea multiflora* (Vochysiaceae) nos dois diferentes grupos de plantas (sem herbivoria e plantas com simulação de herbivoria). As barras representam valores de mediana com interquartil ($U=25,50$; $p<0,001$).33

Figura 10. Volume de néctar extrafloral produzido nos NEFs das inflorescências de *Qualea multiflora* (Vochysiaceae) após o início das observações. (a) plantas sem herbivoria ($F_{[6,104]}=32,79$; $p<0,001$) e (b) plantas com herbivoria ($F_{[6,104]}=58,03$; $p<0,001$). As barras representam os valores de mediana e interquartil. Letras diferentes diferem entre si pelo teste de Comparação Múltipla de Friedman ao nível de 5% de probabilidade.33

Figura 11. Quantidade de calorias no néctar extrafloral das inflorescências de *Qualea multiflora* (Vochysiaceae) nos dois diferentes grupos de plantas (sem herbivoria e plantas com herbivoria floral simulada). As barras representam valores de média e desvio padrão. $t=2.070$; $p<0,05$. ^a – Os dados estão representados por Log ($x+1$).33

Figura 12. Calorias presentes no néctar foliar em *Qualea multiflora* (Vochysiaceae) em todos os horários de coleta nas plantas do grupo (a) sem herbivoria e nas plantas (b) com herbivoria, após o momento do dano. As barras representam os valores de média e desvio padrão.33

Figura 13. Abundância das espécies de formigas em *Qualea multiflora* (Vochysiaceae) nos dois diferentes grupos de plantas (sem herbivoria e plantas com herbivoria floral simulada). As barras representam valores de média e desvio padrão. $t=2.364$; $p<0,05$33

Figura 14. Abundância de formigas em *Qualea multiflora* (Vochysiaceae) nas plantas do grupo (a) sem herbivoria ($F_{[5,89]}=9,122$; $p=0,104$) e (b) com herbivoria ($F_{[5,89]}=5,072$; $p=0,407$), após o momento do dano. As barras representam os valores de média e desvio padrão.33

Figura 15. Abundância das espécies de formigas em *Qualea multiflora* (Vochysiaceae) nas plantas do grupo (a) sem herbivoria e (b) com herbivoria, após o momento do dano. As barras representam os valores de média e desvio padrão.33

Figura 16. Volume de néctar extrafloral foliar e das inflorescências de *Qualea multiflora* (Vochysiaceae) nos dois diferentes grupos de plantas (sem herbivoria e plantas com herbivoria simulada). As barras representam valores de mediana com interquartil. $H=26,56$; $p<0,001$. Letras diferentes diferem entre si pelo teste de Conover-Inman ao nível de 5% de probabilidade.33

Figura 17. Calorias presentes no néctar extrafloral foliar e das inflorescências de *Qualea multiflora* (Vochysiaceae) nos dois diferentes grupos de plantas (sem herbivoria e plantas com herbivoria simulada). As barras representam valores de mediana com interquartil. $H=9,337$; $p<0,05$. Letras diferentes diferem entre si pelo teste de Conover-Inman ao nível de 5% de probabilidade.33

Figura 18. Abundância de formigas em *Qualea multiflora* (Vochysiaceae) nos dois diferentes grupos de plantas (sem herbivoria e plantas com herbivoria simulada). As barras representam valores de mediana com interquartil. $H=18,970$; $p<0,001$. Letras diferentes diferem entre si pelo teste de Conover-Inman ao nível de 5% de probabilidade.33

1 INTRODUÇÃO GERAL

As interações mais antigas entre plantas e insetos registradas até o momento ocorreram no começo do Devoniano, há aproximadamente 400 milhões de anos (KUKALOVÁ-PECK, 1991; LABANDEIRA, 1998; MISOF et al., 2014; SCHOONHOVEN et al., 2005). Alguns fósseis indicam que a primeira interação entre esses dois grupos foi antagônica, herbivoria, em que os insetos se alimentavam de esporos de plantas ou apresentavam o hábito de perfuração e sucção (CHALONER et al., 1991; LABANDEIRA, 1998; LABANDEIRA; SEPKOSKI, 1993; SCHOONHOVEN et al., 2005). Sabe-se que as primeiras plantas surgiram em um período anterior aos primeiros insetos (MISOF et al. 2014). Entretanto, o maior grupo de plantas atual, as angiospermas, surgiu no período Cretáceo, quando os insetos estavam abundantemente presentes (DEL-CLARO, 2012; GRIMALDI; ENGEL, 2005; LABANDEIRA; SEPKOSKI, 1993; SCHOONHOVEN et al., 2005). Observa-se também que o período de maior diversificação dos insetos está sobreposto com o das angiospermas, mostrando o quão esta interação é antiga e inter-relacionada (CHALONER et al., 1991; DEL-CLARO, 2012; GULLAN; CRANSTON, 2010; KUKALOVÁ-PECK, 1991; LABANDEIRA, 1998).

No final do século 19, trabalhos abordando interações entre insetos e plantas começaram a surgir (*e.g.* PACKARD, 1890; RILEY, 1892). Contudo, a maioria desses estudos foi realizada nos últimos 30 anos (*e.g.* CHALONER et al., 1991, LABANDEIRA; BEALL, 1990; SCOTT et al., 1985; SMITH, 1994; STEPHENSON; SCOTT, 1992). Da década de 1960 até o começo da década de 1980, surgiram vários estudos propondo novos mecanismos para explicar o padrão de interação observado entre plantas vasculares e insetos, fortalecendo o caráter multidisciplinar do tema (*e.g.* EHRLICH; RAVEN, 1964; FEENY, 1976; BERENBAUM, 1983). Nas duas últimas décadas, surgiu um interesse maior nos mecanismos que geram a biodiversidade, focando em associações complexas entre plantas e insetos (DEL-CLARO, 2004; THOMPSON, 1994), bem como estudos incluindo comunidades ecológicas (HUNTER et al., 1988), classificações cladísticas (VANE-WRIGHT et al., 1991), composição hierárquica dos diferentes níveis de organização (NOSS, 1990) e análises de redes complexas (BASCOMPTE; JORDANO, 2013). Em uma perspectiva mais atual, a biodiversidade deveria ser vista e avaliada de maneira que compreendesse a riqueza das interações plantas-animais, incluindo não apenas as relações tróficas (PRICE, 2002), mas também aspectos de história de vida, biologia e comportamento de espécies relacionadas (ver OLIVEIRA; DEL-CLARO, 2005; DEL-CLARO et al., 2013).

Registros de relações mutualísticas (benefício mútuo) entre insetos e plantas surgiram no período Permiano (há 290 milhões de anos) (GRIMALDI; ENGEL, 2005; LABANDEIRA, 1998) e, segundo Labandeira (1998), os esporos, o “pré-pólen” e o pólen foram componentes importantes na

dieta dos insetos, sendo esta estratégia alimentar um importante precursor dos mutualismos de polinização do Paleozóico (LABANDEIRA, 1997a, b).

Plantas e insetos coexistem há milhares de anos e evoluíram uma ampla variedade de interações benéficas e deletérias (DEL-CLARO, 2012; STOTZ et al., 1999). Nesse sentido, pode-se citar a polinização, que beneficia ambos envolvidos, com insetos promovendo a fertilização cruzada em plantas durante o processo de coleta de néctar; as plantas carnívoras, que através de armadilhas para insetos, obtêm nitrogênio e fósforo adicionais em ambientes pobres em nutrientes; e, mais frequentemente, as plantas que são danificadas por insetos herbívoros e patógenos microbianos (DEL-CLARO, 2012). Devido a esse último fator, a danificação de tecidos, mecanismos de defesa contra herbívoros e patógenos têm evoluído por milhares de anos, e são, de fato, compartilhados entre muitas famílias de plantas (MARQUIS, 1992; STOTZ et al., 1999).

A interação inseto-planta é um sistema dinâmico, sujeito a uma contínua variação (MELO; SILVA-FILHO, 2002). Ela abrange uma alta variedade de redes de consumo e recurso (e.g. BASCOMPTE, 2009, 2010; DÁTTILO et al., 2013; LANGE et al., 2013), colocando as plantas sobre uma alta pressão evolutiva, principalmente causada por herbívoros (MARQUIS et al., 2012; THOMPSON, 2013). Desta maneira, a fim de reduzir os ataques e os danos causados por insetos, as plantas desenvolveram diferentes mecanismos, incluindo barreiras químicas e físicas (ver CALIXTO et al., 2015; COLEY; BARONE, 1996; CRAWLEY, 1983; FÜRSTENBERG-HÄGG et al., 2013; MARQUIS, 1984, 2012). Dentre as defesas químicas, podem ser citadas: a indução de proteínas defensivas (HARUTA et al., 2001), a liberação de voláteis que podem atrair predadores dos insetos herbívoros (BIRKETT et al., 2000), os metabólitos secundários (BALDWIN, 2001; COLEY; BARONE, 1996; KLIEBENSTEIN et al., 2001; KESSLER, 2015), entre outras. Dentre as defesas físicas, podem ser citadas: a densidade de tricomas (FORDYCE; AGRAWAL, 2001; WOODMAN; FERNANDES, 1991), o látex (AGRAWAL; KONNO, 2009), a dureza foliar (CLISSOLD et al., 2009), entre outras. Além das defesas químicas e físicas, as plantas possuem outra estratégia de defesa, a biótica. Essa defesa é sustentada por uma relação mutualística, na qual a planta fornece alimento e/ou moradia para possíveis predadores de seus herbívoros em troca de proteção (BEATTIE, 1985; RICO-GRAY; OLIVEIRA, 2007). Dentre esses recursos disponibilizados pela planta, o néctar extrafloral é o principal exemplo clássico (ver BEATTIE, 1985; BENTLEY, 1977; RICO-GRAY; OLIVEIRA, 2007). Os nectários extraflorais (NEFs) são estruturas produtoras de néctar que não estão envolvidas com a polinização (KOPTUR, 1992). Além de Koptur (1992), outros trabalhos anteriores já estudavam, definiam e caracterizavam essas estruturas (e.g. BENTLEY, 1977; BONNIER, 1879; ELIAS, 1983; OLIVEIRA; LEITÃO-FILHO, 1987; ZIMMERMAN, 1932). Os NEFs podem ser encontrados em 3.941 espécies pertencentes a 108

famílias de plantas vasculares (WEBER; KEELER, 2013), podendo variar de 8 a 31% dos indivíduos e de 15 a 26% das espécies da flora arbórea em regiões tropicais, especificamente de diferentes localidades do Cerrado (ver OLIVEIRA; LEITÃO-FILHO, 1987; OLIVEIRA; PIE, 1998). Essas glândulas produzem um líquido rico em carboidratos (principalmente sacarose, frutose e glicose), com diversos outros compostos diluídos, tais como: amino ácidos, lipídios, fenóis, alcaloides e compostos orgânicos voláteis (BAKER; BAKER, 1983; GONZÁLEZ-TEUBER; HEIL, 2009; KOPTUR, 1994; WÄCKERS et al., 2001). Essa secreção açucarada atrai grande diversidade de artrópodes predadores, tais como: vespas (CUATLE; RICO-GRAY, 2003; EUBANKS; STYRSKY, 2005; OLSON et al., 2005; WÄCKERS, 2005), aranhas (NAHAS et al., 2012; RUHREN; HANDEL, 1999; WHITNEY, 2004) e, principalmente, formigas (RICO-GRAY; OLIVEIRA, 2007). Vários estudos têm mostrado a eficiente proteção das formigas contra herbívoros (ver ROSUMÉK et al., 2009; MARAZZI et al., 2013; RICO-GRAY; OLIVEIRA, 2007). Porém, em alguns casos, os visitantes dos NEFs não forneceram uma efetiva proteção contra herbívoros (*e.g.* ALVES-SILVA et al., 2014; BYK; DEL-CLARO, 2010; O'DOWD; CATCHPOLE, 1983; NOGUEIRA et al., 2012; LANGE; DEL-CLARO, 2014) ou, ainda, as formigas visitantes de plantas com NEFs podem repelir polinizadores e causar um custo indireto na interação formiga-planta (ver ASSUNÇÃO et al., 2014; HANNA et al., 2015). Esses resultados demonstram a existência de condicionalidades envolvendo a interação artrópode-planta na perspectiva mutualística.

Dentro dessa perspectiva, essas relações tri-tróficas (plantas-formigas-herbívoros) são apontadas como ótimas ferramentas e modelos para melhorar a compreensão sobre a “biodiversidade interativa” (DEL-CLARO, 2004; THOMPSON, 1997, 2005), inclusive na região tropical, onde a abundância e a diversidade dessas associações são notáveis (OLIVEIRA; OLIVEIRA-FILHO, 1991, RICO-GRAY, 1993, DEL-CLARO et al., 1996; OLIVEIRA; PIE, 1998). Isso é especialmente verdadeiro para o Cerrado, o qual apresenta uma considerável quantidade de plantas extranectaríferas e é um dos ecossistemas mais ameaçados no hemisfério sul (DEL-CLARO, 2004; SILVA; BATES, 2002). Nesse sentido, vários autores destacam a importância do estudo das relações entre plantas, formigas e herbívoros nesse ambiente (*e.g.* DEL-CLARO, 2004; DEL-CLARO; TOREZAN-SILINGARDI, 2009; O'DOWD, 1979; RICO-GRAY; OLIVEIRA, 2007).

Portanto, levando em consideração a complexidade da interação formiga-planta e a importância de se compreender as especificidades dos mais diversos tipos de interações ecológicas, a presente dissertação buscou investigar a influência que o néctar extrafloral tem sob a interação planta-formiga em uma área de Cerrado. Para alcançar esse objetivo geral, a dissertação foi dividida em dois capítulos com abordagens diferentes:

Capítulo 1. Defesas foliares anti-herbivoria em *Qualea multiflora* Mart. (Vochysiaceae): mudando de estratégia de acordo com o desenvolvimento foliar.

Objetivo: Quantificar três defesas foliares (tricomos, dureza, e NEFs) de uma árvore abundante do Cerrado, *Qualea multiflora* (Vochysiaceae) (ver APPOLINARIO; SCHIAVINI, 2002), assumindo a hipótese de que as defesas abióticas e bióticas das plantas contra herbívoros podem operar de forma isolada ou em conjunto e com diferentes picos de efetividade ao longo do tempo.

Capítulo 2. Produtividade dos nectários extraflorais e o forrageamento de formigas em *Qualea multiflora* (Vochysiaceae) pós-simulação de herbivoria: uma abordagem sobre Defesa Induzida e Teoria da Ótima Defesa.

Objetivo: Verificar se plantas reconhecem herbivoria foliar e floral, aumentando a produtividade dos NEFs e, conseqüentemente, o recrutamento de formigas, tomando como base a defesa induzida de plantas (KARBAN, MYERS, 1989) e a “teoria da defesa ótima” *sensu* McKey (1974, 1979) e Rhoades (1979).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, A. A.; KONNO, K. Latex: a model for understanding mechanisms, ecology, and evolution of plant defense against herbivory. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v. 40, p. 311-331, 2009.

ALVES-SILVA, E.; BACHTOLD, A.; BARÔNIO, G. J.; TOREZAN-SILINGARDI H. M.; DEL-CLARO, K. Ant-herbivore interactions in an extrafloral nectaried plant: are ants good plant guards against curculionid beetles? **Journal Natural History**, v. 1, p. 1-11, 2014.

APPOLINARIO, V.; SCHIAVINI, I. Levantamento fitossociológico de espécies arbóreas de Cerrado (*stricto sensu*) em Uberlândia, Minas Gerais. **Boletim do Herbário Ezechias Paulo Heringer**, v. 10, p. 57-75, 2002.

ASSUNÇÃO, M. A.; TOREZAN-SILINGARDI, H. M.; DEL-CLARO, K. Do ant visitors to extrafloral nectaries of plants repel pollinators and cause an indirect cost of mutualism? **Flora** v. 209, p. 244–249, 2014.

- BAKER, H. G.; BAKER, I. (1983) A brief historical review of the chemistry of floral nectar. In: Bentley, B.; Elias, T (Eds.). **The Biology of Nectaries**. New York, Columbia University Press, 1983, p. 126–52.
- BALDWIN, I. T. An ecologically motivated analysis of plant-herbivore interactions in native tobacco. **Plant Physiology**, v. 127, p. 1449-1458, 2001.
- BASCOMPTE, J. Disentangling the web of life. **Science**, 325, 416–419, 2009.
- BASCOMPTE, J. Structure and dynamics of ecological networks. **Science**, 329, 765–766, 2010.
- BASCOMPTE, J.; JORDANO, P. **Mutualistic networks**. Princeton University Press, 2013. 224 pp.
- BEATTIE, A.J. 1985. **The Evolutionary Ecology of Ant-Plant Mutualisms**. New York: Cambridge University Press. 182 pp.
- BENTLEY, B. L. Extrafloral nectaries and protection by pugnacious bodyguards. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 8, p. 407–427, 1977.
- BERENBAUM, M. Coumarins and caterpillars: a case for coevolution. **Evolution**, v. 37, p. 163–79, 1983.
- BIRKETT, M. A.; CAMPBELL, C. A. M.; CHAMBERLAIN, K.; GUERRIERI, E.; HICK, A. J.; MARTIN, J. L.; MATTHES, M.; NAPIER, J. A.; PETTERSSON, J.; PICKETT, J. A.; POPPY, G. M.; POW, E. M.; PYE, B. J.; SMART, L. E.; WADHAMS, G. H.; WADHAMS, L. J.; WOODCOCK, C. M. New roles for cis-jasmone as an insect semiochemical and in plant defense. **Proc. Natl Acad. Sci.**, v. 97, p. 9329-9334, 2000.
- BONNIER, G. Les nectaires: étude critique, anatomique et physiologique. **Annales des Sciences Naturelles, Botanique**. 212 pp. 1879.
- BYK, J.; DEL-CLARO, K. Nectar- and pollen-gathering *Cephalotes* ants provide no protection against herbivory: a new manipulative experiment to test ant protective capabilities. **Acta Ethologica**, v. 13, p. 33–38, 2010.
- CALIXTO, E. S.; LANGE, D.; DEL-CLARO, K. Foliar anti-herbivore defenses in *Qualea multiflora* Mart. (Vochysiaceae): changing strategy according to leaf development. **Flora**, v. 212, p. 19-23, 2015.

- CHALONER, W. G.; SCOTT, A. C.; STEPHENSON, J. Fossil evidence for plant-arthropod interactions in the Palaeozoic and Mesozoic. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B**, v. 333, p. 177-186.
- CLISSOLD, F. J.; SANSON, G. D.; READ, J.; SIMPSON, S. J. Gross versus net income: how plant toughness affects performance of an insect herbivore. **Ecology**, v. 90, p. 3393–3405, 2009.
- COLEY, P. D.; BARONE, J. A. Herbivory and plant defenses in tropical forests. **Annu. Rev. Ecol. Syst.**, v. 27, p. 305–335, 1996.
- CRAWLEY, M. J. **Herbivory, the dynamics of animal–plant interactions**. Oxford: Blackwell Science Publications, 1983. 437 pp.
- CUAUTLE, M.; RICO-GRAY, V. The effect of wasps and ants on the reproductive success of the extrafloral nectaried plant *Turnera ulmifolia* (Turneraceae). **Functional Ecology**, v. 17, p. 417–423, 2003.
- DÁTTILO, W.; GUIMARÃES, P. R.; IZZO, T. J. Spatial structure of ant–plant mutualistic networks. **Oikos**, v. 122, p. 1643–1648, 2013.
- DEL-CLARO, K. Multitrophic relationships, conditional mutualisms and the study of interaction biodiversity in tropical savannas. **Neotropical Entomology**, v. 33, n. 6, p. 665-672, 2004.
- DEL-CLARO, K. Origens e importância das relações plantas-animais para a ecologia e conservação. In: Del-Claro, K.; Torenzan-Silingardi, H. M. (Eds.). **Ecologia de interações plantas-animais: uma abordagem ecológico-evolutiva**. Rio de Janeiro, Technical Books, 2012, p. 37-50.
- DEL-CLARO, K.; BERTO, V.; RÉU, W. Effect of herbivore deterrence by ants on the fruit set of an extrafloral nectary plant, *Qualea multiflora* (Vochysiaceae). **Journal of Tropical Ecology**, Aberdeen, v. 12, p. 887-892, 1996.
- DEL-CLARO, K.; STEFANI, V.; LANGE, D.; VILELA, A. A.; NAHAS, L.; VELASQUES, M.; TOREZAN-SILINGARDI, H. M. The importance of natural history studies for a better comprehension of animal-plant interaction networks. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 2, p. 439-448, 2013.
- DEL-CLARO, K.; TOREZAN-SILINGARDI, H. M. Insect-Plant Interactions: New pathways to a better comprehension of ecological communities in neotropical savannas. **Neotrop. Entomol.**, v. 38, p. 159–164, 2009.

- ELIAS, T. S. Extrafloral Nectaries: their structure and distribution. In: Bentley, B.; Elias, T. S. (Eds.). **The Biology of Nectaries**. New York, Columbia University Press, 1983, p. 174-203.
- EHRlich, P. R.; RAVEN, P. H. Butterflies and plants: A study in coevolution. **Evolution**, v. 18, p. 586-608, 1964.
- EUBANKS, M. D.; STYRSKY, J. D. The Effects of Plant Feeding on the Performance of Omnivorous 'Predators'. In: Wäckers, F. L.; van Rijn, P.; Bruin, J. (Eds.). **Plant-Provided Food for Carnivorous Insects: A Protective Mutualism and its Applications**. Cambridge University Press, Cambridge, 2005, p. 148-177.
- FEENY, P. Plant apparency and chemical defense. **Recent Adv. Phytochem.**, v. 10, p. 1-40, 1976.
- FORDYCE, J. A.; AGRAWAL, A. A. The role of plant trichomes and caterpillar group size on growth and defense of the pipevine swallowtail *Battus philenor*. **J. Animal Ecol.**, v. 70, p. 997-1005, 2001.
- FÜRSTENBERG-HÄGG, J.; ZAGROBELNY, M.; BAK, S. Plant Defense against Insect Herbivores. **International Journal of Molecular Sciences**, Switzerland, v. 14, n.5, p. 10242-10297, 2013.
- GONZÁLEZ-TEUBER, M.; HEIL, M. Nectar chemistry is tailored for both attraction of mutualists and protection from exploiters. **Plant Signaling & Behavior**, v. 4, p. 809-813, 2009.
- GRIMALDI, D.; ENGEL, M. S. **Evolution of the insects**. Cambridge University Press, 2005. 755 pp.
- GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. S. **The Insects. An outline of Entomology**. Chapman & Hall, London, 2010. 584 pp.
- HANNA, C.; NAUGHTON, I.; BOSER, C.; ALARCÓN, R.; HUNG, K. J.; HOLWAY, D. Floral visitation by the Argentine ant reduces bee visitation and plant seed set. **Ecology**, v. 96, p. 222-230, 2015.
- HARUTA, M.; MAJOR, I. T.; CHRISTOPHER, M. E.; PATTON, J. J.; CONSTABEL, C. P. A Kunitz trypsin inhibitor gene family from trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx.): cloning, functional expression, and induction by wounding and herbivory. **Plant Mol. Biol.**, v. 46, p. 347-359, 2001.

KARBAN, R.; MYERS, J.H. Induced plant responses to herbivory. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 20, p. 331-348, 1989.

KESSLER, A. The information landscape of plant constitutive and induced secondary metabolite production. **Current Opinion in Insect Science**. v. 8, p. 47-56, 2015.

KLIEBENSTEIN, D. J.; KROYMANN, J.; BROWN, P., et al. Genetic control of natural variation in Arabidopsis glucosinolate accumulation. **Plant Physiol.**, v. 126, p. 811-825, 2001.

KOPTUR, S. Extrafloral nectary-mediated interactions between insects and plants. In: Bernays, E. (Ed.). **Insect-Plant Interactions**. Boca raton, CRC Press, 1992, p. 81-129.

KOPTUR, S. Floral and extrafloral nectars of neotropical Inga trees: a comparison of their constituents and composition. **Biotropica**, v. 26, p. 276–284, 1994.

KUKALOVÁ-PECK, J. Fossil history and the evolution of hexapod structures. In: Naumann, I. D.; Carne, P. B.; Lawrence, J. F. et al. (Eds.). **The Insects of Australia: A Textbook for Students and Research Workers**. Cornell University Press, v. 1, p. 141-179, 1991.

LABANDEIRA, C. C. Insect mouthparts: ascertaining the paleobiology of insect feeding strategies. **Annu. Rev. Ecol. Syst.**, v. 28, p. 153–93, 1997a.

LABANDEIRA, C. C. Permian pollen eating. **Science**, v. 277, p. 1422–23, 1997b.

LABANDEIRA, C. C. Early history of arthropod and vascular plant associations. **Annual Review of Earth and Planetary Sciences**, v. 26, p. 329–77, 1998.

LABANDEIRA, C. C.; BEALL, B. S. Arthropod terrestriality. In: Mikulic, D. (Ed.). **Arthropods: Notes for a Short Course**. Knoxville, Univ. Tenn. Press, p. 214–56, 1990.

LABANDEIRA, C. C.; SEPKOSKI, J. J. Insect diversity in the fossil record. **Science**, v. 261, p. 310–315, 1993).

LANGE, D.; DÁTTILO, W.; DEL-CLARO, K. Influence of extrafloral nectary phenology on ant-plant mutualistic networks in a neotropical savanna. **Ecol. Entomol.**, v. 38, p. 463–469, 2013.

LANGE, D.; DEL-CLARO, K. Ant-plant interaction in a tropical savanna: May the network structure vary over time and influence on the outcomes of associations? **PLoS ONE**, v. 9, e105574,

2014.

MARAZZI, B.; BRONSTEIN, J. L.; KOPTUR, S. The diversity: ecology and evolution of extrafloral nectaries: current perspectives and future challenges. **Ann. Bot.**, v. 111, p. 1243–1250, 2013.

MARQUIS, R. J. Selective impact of herbivores. In: Fritz, R. S.; Simms, E. L. (Eds.). **Ecology and Plant Resistences to Herbivores and Pathogens**. Chicago, University of Chicago Press, p. 301–325, 1992.

McKEY, D. Adaptive patterns in alkaloid physiology. **American Naturalist**, v. 108, p. 305–320, 1974.

McKEY, D. The distribution of plant secondary compounds within plants. In: Rosenthal, G. A.; Janzen, D. H. (Eds.). **Herbivores: their interactions with secondary plant metabolites**. Academic press, New York, p. 55–133, 1979.

MELO, M. O.; SILVA-FILHO, M. C. Plant-insect interaction: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 14, p. 71–81, 2002.

MISOF, B.; Liu, S.; Meusemann, K., et al. Phylogenomics resolves the timing and pattern of insect evolution. **Science**, v. 346, p. 763–767, 2014.

NAHAS, L.; GONZAGA, M. O.; DEL-CLARO, K. Intraguild interactions between ants and spiders reduce herbivory: an extrafloral nectaried tree of tropical savanna. **Biotropica**, v. 44, p. 498–505, 2012.

NOGUEIRA, A.; GUIMARAES, E.; MACHADO, S. R.; LOHMANN, L. G. Do extrafloral nectaries present a defensive role against herbivores in two species of the family Bignoniaceae in a Neotropical savanna? **Plant Ecology**, v. 213, p. 289–301, 2012.

O'DOWD, D. J. Foliar nectar production and ant activity on a neotropical tree, *Ochroma pyramidale*. **Oecologia**, v. 43, p. 233–248, 1979.

O'DOWD, D. J.; CATCHPOLE, E. A. Ants and extrafloral nectaries: no evidence for plant protection in *Helichrysum* spp. –ant interactions. **Oecologia**, v. 59, p. 191–200, 1983.

OLIVEIRA, P. S.; LEITÃO-FILHO, H. F. Extrafloral Nectaries: Their taxonomic distribution and abundance in the woody flora of Cerrado vegetation in Southeast Brazil. **Biotropica**, v. 19, p. 140–148, 1987.

- OLIVEIRA, P. S.; OLIVEIRA-FILHO, A. T. Distribution of extrafloral nectaries in the woody flora of tropical communities in Western Brazil. In: Price, P. W.; Lewinsohn, T. M.; Fernandes, G. W.; Benson, W. W. (Eds.). **Plant-Animal Interactions**. p. 163-175, 1991.
- OLIVEIRA, P. S.; PIE, M. R. Interaction between ants and plants bearing extrafloral nectaries in cerrado vegetation. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 27, n. 2, p. 161-176, 1998.
- OLSON, D. M.; TAKASU, K.; LEWIS, W. J. Food needs of adult parasitoids: behavioral adaptations and consequences. In: Wäckers, F. L.; van Rijn, P.; Bruin, J. (Eds.). **Plant-Provided Food for Carnivorous Insects: A Protective Mutualism and its Applications**. Cambridge University Press, 2005, p. 137-147.
- PACKARD, A. S. **Insects Injurious to Forest and Shade Trees**. Washington, DC, Gov. Print. Off, 1890. 957 pp.
- RHOADES, D. F. Evolution of plant defense against herbivores. In: Rosenthal, G. A.; Janzen, D. H. (Eds.). **Herbivores: their interaction with secondary metabolites**. Academic Press, New York, 1979, 1–55.
- RICO-GRAY, V. Use of plant-derived food resources by ants in the dry tropical lowlands of coastal Veracruz, Mexico. **Biotropica**, v. 25, p. 301-315, 1993.
- RICO-GRAY, V.; OLIVEIRA, P. S. **The ecology and evolution of ant-plant interactions**. The University of Chicago Press, Chicago, 2007. 331 pp.
- RILEY, C. V. The yucca moth and yucca pollination. **Annu. Rep. Mo. Bot. Gard.** v. 3, p. 99–170, 1892.
- ROSUMEK, F. B.; SILVEIRA, F. A. O.; NEVES, F. S.; BARBOSA, N. P.; DINIZ, L.; OKI, Y.; PEZZINI, F.; FERNANDES, G. W.; CORNELISSEN, T. Ants on plants: a meta-analysis of the role of ants as plant biotic defenses. **Oecologia**, v. 160, p. 537-549, 2009.
- RUHREN, S.; HANDEL, S. N. Jumping spiders (Salticidae) enhance the seed production of a plant with extrafloral nectaries. **Oecologia**, v. 119, p. 227–230, 1999.
- SCHOONHOVEN, L. M.; van Loon, J. J. A.; Dicke, M. **Insect-Plant Biology**. Oxford, University Press, Oxford, 2005. 440 pp.
- SILVA, J. M. C.; BATES, J. M. Biogeographic Patterns and Conservation in the South American Cerrado: A Tropical Savanna Hotspot The Cerrado, which includes both forest and savanna

habitats, is the second largest South American biome, and among the most threatened on the continent. **BioScience**, v. 52, n. 3, p. 225-234, 2002.

SCOTT, A. C.; CHALONER, W. G.; PATERSON, S. Evidence of pteridophyte-arthropod interactions in the fossil record. **Proc. R. Soc. Edinburgh**, v. 86B, p. 133–140, 1985.

SMITH, D. M. Plant-insect interactions in the fossil record. **Phytophaga**, v. 6, p. 35–49, 1994.

STEPHENSON, J.; SCOTT, A. C. The geological history of insect-related plant damage. **Terra Nova**, v. 4, p. 542–52, 1992.

STOTZ, H. U.; KROYMANN, J., MITCHELL-OLDS, T. Plant–insect interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 2, p. 268–272, 1999.

THOMPSON, J. N. **The Coevolutionary Process**. Chicago, Univ. Chicago Press, 1994. 376 pp.

THOMPSON, J. N. Conserving interaction biodiversity. In: Pickett, S. T. A.; Ostfeld, R. S.; Shachak, M.; Likens, G. E. (Eds.). **The ecological basis of conservation: Heterogeneity, ecosystems, and biodiversity**. Chapman & Hall, New York, 1997. p. 285-293.

THOMPSON, J. N. **The geographic mosaic of coevolution**. University of Chicago Press, Chicago, 2005. 443 pp.

THOMPSON, J. N. **Relentless Evolution**. University of Chicago Press, Chicago, 2013. 499 pp.

WÄCKERS, F. L. Suitability of (extra-) floral nectar, pollen, and honeydew as insect food Sources. In: Wäckers, F. L.; van Rijn, P.; Bruin, J. (Eds.). **Plant-Provided Food for Carnivorous Insects: A Protective Mutualism and its Applications**. Cambridge University Press, 2005, pp. 17-74.

WÄCKERS, F. L.; ZUBER, D.; WUNDERLIN, R.; KELLER, F. The effect of herbivory on temporal and spatial dynamics of foliar nectar production in cotton and castor. **Ann. Bot.** v. 87, p. 365–370, 2001.

WEBER, M. G.; KEELER, K. H. The phylogenetic distribution of extrafloral nectaries in plants. **Annals of Botany**, v. 111, p. 1251-1261, 2013.

WHITNEY, K. D. Experimental evidence that both parties benefit in a facultative plant–spider mutualism. **Ecology**, v. 85, p. 1642–1650, 2004.

WOODMAN, G. W.; FERNANDES, G. W. Differential mechanical defence: herbivory, evapotranspiration, and leaf-hairs. **Oikos**, v. 60, p. 11–19, 1991.

ZIMMERMAN, J. Über die extrafloren nektarien der Angiospermen. **Beihefte Botanisches Zentralblatt**, v. 49, p. 99–196, 1932.

Capítulo 1

Defesas foliares anti-herbivoria em *Qualea multiflora* Mart. (Vochysiaceae): mudando de estratégia de acordo com o desenvolvimento foliar

Eduardo Calixto Soares¹, Denise Lange², Kleber Del Claro²

¹Pós-Graduação em Entomologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil

²Laboratório de Ecologia Comportamental e de Interações (LECI), Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia, Cx.P. 593, CEP 38400-902 Uberlândia, MG, Brasil.

Artigo publicado na revista Flora (Jena)

Calixto, E.S.; Lange, D.; Del-Claro, K. 2015. Foliar anti-herbivore defenses in *Qualea multiflora* Mart. (Vochysiaceae): changing strategy according to leaf development. **Flora** 212: 19-23. [doi:10.1016/j.flora.2015.02.001](https://doi.org/10.1016/j.flora.2015.02.001)

Defesas foliares anti-herbivoria em *Qualea multiflora* Mart. (Vochysiaceae): mudando de estratégia de acordo com o desenvolvimento foliar

Eduardo Calixto Soares, Denise Lange, Kleber Del Claro

Resumo

O conhecimento sobre os sistemas de defesa contra herbivoria é essencial para o entendimento das relações tróficas nos ecossistemas terrestres. Diferentes defesas podem atuar sozinhas ou em combinação durante o desenvolvimento foliar. Nesse estudo, foram explorados os efeitos das três defesas mais conspícuas encontradas em folhas de *Qualea multiflora* (Vochysiaceae) durante o desenvolvimento foliar, as quais são: (1) tricomas, (2) dureza foliar e (3) nectários extraflorais (NEFs). Para verificar a eficiência das defesas foliares, a herbivoria foliar foi quantificada nos diferentes estágios de desenvolvimento da folha. Os resultados demonstram que as três defesas avaliadas variam em efetividade durante o desenvolvimento foliar. O número de tricomas foi maior durante o desenvolvimento inicial da folha, a dureza foi maior após a expansão completa da folha, e os NEFs (defesa biótica) estiveram ativos apenas durante o período mediano do desenvolvimento. Os resultados indicam que a herbivoria foliar foi similar nos diferentes estágios analisados e que *Q. multiflora* sincroniza suas defesas foliares com aperfeiçoando o desempenho da proteção anti-herbívoros durante o tempo.

Palavras-Chave: Nectários extraflorais, Dureza foliar, Herbivoria, Tricomas, Cerrado

Abstract

Knowledge about plant defense systems against herbivory is crucial to understanding trophic relationships in terrestrial ecosystems. Distinct defenses may act either alone or in combination during foliar sprouting. In our study, we explored the effect of the three most conspicuous defenses found in the leaves of *Qualea multiflora* (Vochysiaceae) during foliar sprouting, which are: (1) the presence of trichomes, (2) foliar toughness and (3) activity of extrafloral nectaries (EFNs). In addition, we quantified foliar herbivory at different leaf stages, and determined that the three defenses evaluated vary in effectiveness during leaf development. The number of trichomes was higher during early leaf development, toughness at the end, and the activity of EFNs (biotic defense) during the middle period. Foliar herbivory was similar at different leaf ages. The results indicate that *Q. multiflora* synchronizes its foliar defenses in order to optimize the performance in anti-herbivory protection over time.

Keywords: Extrafloral nectaries, Foliar toughness, Herbivory, Trichomes, Cerrado

1 Introduction

Plant–herbivore interactions are old and shaped the structural bases of most terrestrial environments (Ehrlich and Raven, 1964; Thompson, 2009). These relationships directly involve a wide variety of consumption-resource networks (*e.g.*, Bascompte, 2009, 2010; Dáttilo et al., 2013; Lange et al., 2013), putting plants under enormous evolutionary pressure caused by higher trophic levels, mainly herbivores (Marquis et al., 2012; Thompson, 2013). In this sense, researchers are unanimous in highlighting the importance of chemical and physical plant features that represent the first line of defense against herbivory (Crawley, 1983; Marquis et al., 2012).

Chemical defenses are composed of secondary compounds, such as alkaloids and tannins (Coley and Barone, 1996; Croteau et al., 2000; Rosenthal and Berenbaum, 1992; Schaller, 2008). Physical defenses are mainly morphological or mechanical, such as the presence of leaf toughness, trichomes, thorns or latex (Crawley, 1983; Davidson et al., 1989; Marquis et al., 2012). Trichomes have been considered an effective defense against herbivorous insects (Agren and Schemske, 1993; Kennedy, 2003; Woodman and Fernandes, 1991). Toughness can be enhanced during leaf development (Peeters, 2002), and fully expanded leaves have greater foliar toughness than young ones (Coley and Barone, 1996). Leaf toughness may act as a potent defense affecting morphology, feeding behavior, and ultimately spatial and temporal patterns of herbivores (Crawley, 1983; Raupp, 1985; Korndörfer and Del-Claro, 2006).

Plants also commonly possess other defensive strategies like biotic defense, such as the association with a protective predator (Del-Claro et al., 2013; Nahas et al., 2012; Rico-Gray and Oliveira, 2007). In this situation, plants provide food and/or shelter for predators in exchange for protection. Extrafloral nectaries (EFNs) are a classic example of this type of defense (Byk and Del-Claro, 2011). These glands produce a liquid rich in carbohydrates, with diluted compounds of amino acids, lipids, phenols, alkaloids, and volatile organic compounds (Blüthgen et al., 2004; González-Teuber and Heil, 2009; Koptur, 1994; Wäckers et al., 2001), attracting a great diversity of arthropod predators, including ants (Choate and Lundgren, 2013; Marazzi et al., 2013; Pereira and Trigo, 2013). Several studies have proven the efficiency of ant protection against foliar herbivores on plants (Rico-Gray and Oliveira, 2007; Lange and Del-Claro, 2014; Vilela et al., 2014). However, others have failed or just showed partial effective defense provided by ants to plants' vegetative parts (Alves-Silva et al., 2014). Indeed, Assunção et al. (2014) showed that ant visitors to extrafloral nectaries of plants may repel pollinators and cause an indirect cost of mutualism. In addition to ants, spiders that visit EFNs can also provide protection (see Nahas et al., 2012). When located in the leaves, EFNs develop in the early period of sprouting and their activity (time and productivity) is

highly variable among species (Del-Claro and Torezan-Silingardi, 2009), depending on the plants' phenological development (Vilela et al., 2014).

Assuming our main hypothesis that abiotic and biotic plant defenses against herbivores may operate either in isolation or in conjunction, we quantified three leaf defenses (trichomes, toughness, and EFNs) of one of the most abundant trees of the Brazilian savanna, *Qualea multiflora* (Vochysiaceae) (see Appolinario and Schiavini, 2002). For this, we formulated the following questions: (i) do these defenses vary during leaf development? (ii) what is the period of peak activity of each type of defense? (iii) do peak effectiveness of defenses overlap? and (iv) does leaf area loss caused by herbivores vary depending on leaf age?

2 Material and methods

2.1 Study site and plant species

Fieldwork was carried out in the Ecological Reserve of the Clube Caça e Pesca Itororó de Uberlândia (CCPIU; 18°57'45''S, 48°17'30''W), MG, Brazil, from October 2010 to January 2011. The dominant vegetation is savanna, Cerrado *sensu stricto*, composed of trees of 2–8 m tall with an understory containing shrubs, grasses, and spreading perennials. The climate is humid and rainy from September to April (spring–summer), and dry from May to August (autumn–winter) (see Ferreira and Torezan-Silingardi, 2013 for a more detailed characterization of the area).

The species chosen for this study was *Qualea multiflora* Mart. (Vochysiaceae), a tree species with EFNs that is very abundant in the study site. This species has EFNs in the insertion of the petiole and non-glandular trichomes in the leaf blade. The EFNs attract ants that effectively protect the plant, increasing fruit production (see Del-Claro et al., 1996). However, spiders can also be attracted by and feed on *Q. multiflora* EFNs, reducing the leaf area lost to herbivore activity (Nahas et al., 2012).

2.2 Defense and leaf herbivory

In the first week of October we tagged 19 individuals of *Q. multiflora* presenting the same phenological characteristics (stems resprouting) and height (3m). The first three branches producing new leaves were tagged on each plant, and in December these branches were cut and put in numbered plastic bags. Under laboratory conditions we numbered each leaf of each branch from “1” (newest – small and soft, very flexible) to “5” (oldest – largest and toughest, not flexible) representing the foliar age (average of ten leaves per branch; as the leaves grow opposite one another, generally a pair of leaves represented an age). Using manual counters and a stereo microscope, we counted all the trichomes in a 3.15 mm² area in the medial region of the abaxial leaf surface near the midrib. We chose this small area because of the large number of trichomes on the leaves. We photographed all the leaves in the laboratory and measured the percentage of foliar area

lost using the program ImageJ 1.47. In addition, to confirm leaf size, we measured the dimensions of each leaf (length and width of the middle portion) with the aid of a digital caliper. We evaluated the presence of active EFNs visually, observing the presence or absence of necrosis of the glands in the branches collected to determine the number of trichomes (*e.g.*, Oliveira and Leitão-Filho, 1987).

To verify the productivity of EFNs, we scored three EFNs on the three distinct branches from nine plants in the field and evaluated them daily. All branches were washed and bagged daily, and the volume of extrafloral nectar and its sugar concentrations were measured at 10 pm (highest activity according to Lange et al., 2013) using a microcapillary graduate and refractometer (Eclipse).

To check foliar toughness, we collected three new leaves at ages 1 and 2 in October and three old leaves at ages 4 and 5 in January from 20 individuals. These leaves were drilled with a manual penetrometer (Chatillon type 516; *e.g.*, Cook-Paton and Agrawal, 2014). This device measures foliar toughness indirectly, through the force (in grams) required to punch through 1 mm² of leaf area (gf/mm²) (Feeny, 1970). We perforated each leaf twice, in the lamina between leaf veins, and averaged the two values for each leaf for use in the analyzes.

2.3 Data analysis

To test the differences between the number of trichomes, and leaf size between the five developmental stages (foliar ages) evaluated, we used a nested ANOVA test (F) with Tukey's post-hoc. To compare number of trichomes, we transformed the data into log₁₀ values. We used the Friedman test with Dunn's post-hoc to compare the volume of nectar produced by the EFN and the nectar sugar concentration on different days of EFNs activity using the average values of productivity from three EFNs evaluated in each plant (n=9). To compare the toughness between leaves at the initial (age 1–2) and final (4–5) developmental stages, we used a paired t-test comparing the average values from two leaves of each plant (n=20). We used the Chi-square test with Yates's correction to do pairwise comparison on the percentage of active EFNs at each stage of leaf development. We used the Friedman test to compare the loss of foliar area (herbivory) on each leaf between the five developmental stages, using the average value of leaves found at each age. Subsequently, we verified the relation between the number of trichomes and leaf size using the Spearman correlation. We conducted all analyzes using the software Systat 13.0.

3 Results

The size of *Q. multiflora* leaves increased ($F_{90,414} = 2.284$; $p < 0.001$) according to foliar development, from age 1 (1.42 ± 0.95 cm²; mean $\pm$ SD) up to age 5 (1.87 ± 0.68 cm²). However, the density of trichomes decreased as the leaves matured and reached full expansion ($F_{90,414} = 5.037$; $p < 0.001$; Fig. 1a). Indeed, leaf size and number of trichomes were negatively correlated ($r_s = -0.247$;

$n = 505$; $p < 0.001$). Foliar toughness was significantly greater in old leaves (t -paired = 15.31; d.f. = 19; $p < 0.001$; Fig. 1b). Thus, as they age, leaves of *Q. multiflora* present fewer trichomes, but become tougher.

Figure 1. Characteristics of *Qualea multiflora* (Vochysiaceae) leaves according to five distinct developmental stages (foliar ages), from initial expansion (1) to full expansion and maximum toughness (5). (a) the density of trichomes (nested ANOVA test with Tukey's post-hoc test); (b) foliar toughness (t -paired test); and (c) percentage of leaves with active EFNs (χ^2 test – Yates correction). The symbol ** (in “a”, “b” and “c”) and the distinct letters (in “a” and “c”) indicate a significant statistical difference ($p < 0.05$). The bars in “a” and “b” are mean $\pm$ SE ($n = 20$).

On the other hand, expanded but flexible leaves (foliar ages 2 and 3) were those that most commonly presented active EFNs ($\chi^2=30.79$; d.f. = 4; $p < 0.001$; Fig. 1c). The EFNs started their activity when leaves reached 3.9 ± 1.4 cm (mean $\pm$ SD) in length, and stopped at 5.0 ± 1.8 cm (mean $\pm$ SD), remaining active for up to 10 days (4.2 ± 2.2 days). The EFNs produced both greater volume and concentration of sugar in the first five days of activity (Friedman's test = 29.86; $n = 9$; $p < 0.001$ for volume; Friedman's test = 34.88; $n = 9$; $p < 0.001$ for concentration). Leaf area loss was similar among foliar ages (Friedman's test = 2.715; $n = 19$; $p > 0.05$), despite the intermediate stages of development (age 2 and 3) presenting more damaged areas.

4 Discussion

Activity of distinct anti-herbivore defenses differs between different stages of development of the leaves in *Qualea multiflora*. Thus, our data corroborate our main hypothesis that abiotic and biotic plant defenses may replace each other over time and/or produce a complementary or additive protective effect against herbivores.

New leaves of this member of Vochysiaceae (foliar age 1) presented a larger number of trichomes. The presence of trichomes in plants provides defense against herbivores by impeding their locomotion (Davidson et al., 1989; Styrsky et al., 2006). Davidson et al. (1989) showed that herbivores move more slowly on plant surfaces with trichomes and end up being more susceptible to predation by ants. Weinhold (2012) showed that the presence of trichomes is the most important defense of *Nicotiana attenuata* (Solanaceae) against insect attack. In many plant species the number of trichomes is highest in new leaves, but decreases over the course of development and foliar expansion (Maffei et al., 1989; Pérez-Estrada et al., 2000; Werker et al., 1993). This suggests that in new leaves, which have not formed epidermal tissue, trichomes may have a functional role analogous to the epidermis of adult or old leaves (Karabourniotis and Fasseas, 1996). Trichomes become less important at more advanced stages of foliar development (i.e., when the epidermis is formed), and so become old and fall off (Levin, 1973; Werker, 2000).

Although there was no significant difference, leaves of *Q. multiflora* at an intermediate stage (foliar age 2 and 3) suffered greater leaf area loss (herbivory). This is understandable due to the fact that very young leaves had more trichomes and a smaller size, and were therefore less attractive to insect herbivores. Herbivores like butterfly larvae and beetles may require a physical support, a minimal surface area to remain on the host plant, such as a developed leaf or petal (e.g. Bächtold et al., 2014). Young leaves of *Q. multiflora*, despite the fact that they possessed less active EFNs, produced nectar with a higher sugar concentration, attracting ants and activating biotic defenses. On the other hand, *Q. multiflora* leaves in the stage of final expansion become harder and have increasing foliar toughness, reducing their attraction for herbivores. Thus, leaves in the intermediate

phase (age 2 and 3) are losing trichomes yet still have a soft tissue, therefore rendering them more dependent on biotic defenses and maintaining more active EFNs. However, it has been proposed that the young leaves are of greater value to plants (Harper, 1989) and offer greater nutritional quality to herbivores than older leaves (Stamp and Bowers, 1990). Thus, it would be an effective strategy for a plant to produce phenolics for defense against herbivores in young leaves (Varanda et al., 2005). We suggest chemical analysis of leaves of EFN-bearing plants as an important complementary study in these ant–plant mutualisms.

Distinct plant defenses can be physiologically compatible (Agrawal, 2007; Coley and Aide, 1991) or the pressure and selection exerted by herbivores on distinct plants can direct them to different defenses, one at time (Agrawal and Fishbein, 2006). According to Varanda et al. (2005), during foliar growth in the Brazilian tropical savanna (Cerrado) the leaves acquire new defenses as a result of the accumulation of secondary metabolites and the development of tissues (sclerenchyma and hypodermis) resulting in greater foliar toughness. Korndörfer and Del-Claro (2006) showed for the Cerrado plant *Lafoensia pacari* (Lythraceae) that ants attracted by nectar from EFNs provided an effective defense against chewing herbivores during leaf expansion. However, after the leaves have expanded, the EFNs halt their nectar production and ants no longer protect the plants against herbivores. Thus, the leaves begin to accumulate silicon and become tougher suggesting the occurrence of an induced response to herbivory in this plant species. Other authors have also observed this increase in foliar toughness with the accumulation of Si, which resulted in reduced damage by herbivores (Korndörfer and Datnoff, 1995; McNaughton et al., 1985).

Different anti-herbivory tactics can be useful to plants under different selective pressures. Such pressures are unique to each plant species, which have distinct characteristics distributed within a continuous defense pattern against herbivores (Kursar and Coley, 2003). We suggest that the foliar defenses of *Q. multiflora* change according to plant phenology, with different peaks of effectiveness for each type of defense, but in sum providing an efficient anti-herbivory system (Fig. 2).

Qualea multiflora trees resprout in flush, producing large numbers of soft young leaves of very small size that are fully covered by trichomes, which provide an initial physical defense against its main herbivores, butterfly larvae and beetles (Del-Claro et al., 1996; Pires and Del-Claro, 2014). In their initial expansion phase, the leaves lose trichomes but still have soft tissue that attracts herbivores. The plant quickly activates its biotic defense (EFNs), attracting predators like ants and spiders that defend the plant against herbivores (Nahas et al., 2012). Late in development, the EFNs become sclerotized, stopping nectar production, and the plant instead invests in toughness to protect its leaves, as occurs in *Lafoensia pacary* (Korndörfer and Del-Claro, 2006). This scenario

reinforces the admission that biotic defense in plants mediated by EFNs are efficient in tropical systems. According to Davidson et al. (1989), large numbers of trichomes may hinder the movement of ants on the surface of plants, affecting the response of ants to the activity of EFNs and consequently affect the biotic protection of the plants. This influence of trichomes on plant occupation by ants can cause a trade-off between trichomes and morphological structures involved in attracting predators of herbivores. Thus, according to Nogueira et al. (2012), trichomes may indirectly affect the coevolution between ants and plants with EFNs, because they represent a high cost for plants due to their reducing the number of predatory herbivorous insects.

Figure 2. Different anti-herbivory tactics can be useful to plants under different selection pressures. *Qualea multiflora* (Vochysiaceae) trees resprout while in flush, producing large numbers of soft young leaves of very small size fully covered by trichomes. In the initial expansion phase, the leaves shed trichomes and attract herbivores. The plant then quickly activates its EFNs, attracting predators like ants and spiders that defend the plant against herbivores. In the final stage of leaf development, the EFNs become sclerotized, stopping nectar production, and the plant switches to investing in toughness in order to protect its leaves.

Several studies have demonstrated the effectiveness of anti-herbivory defenses, checking each defense separately, such as trichomes (Tian et al., 2012; Weinhold, 2012), biotic defense mediated by EFNs (Del-Claro and Oliveira, 1999; Lange and Del-Claro, 2014; Nahas et al., 2012; Nascimento and Del-Claro, 2010), and foliar toughness (Korndörfer and Del-Claro, 2006; Varanda et al., 2005). It has to be considered that plants (e.g., *Q. multiflora*) synchronize their foliar defenses over time in order to provide better performance in protection, since the overlap of certain defensive mechanisms may indirectly influence the life history of the plants, and the evolutionary course of their defenses and interactions.

5 Acknowledgements

We thank G. Barônio and A.A. Vilela for help in the field and the laboratory, and H.L. Vasconcelos for loan of the manual perfurometer. We also thank H. Heilmeyer for valuable corrections and suggestions in the manuscript. We also thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (K. Del Claro: 476074/2008-8; 472046/2011-0; 301248/2009-5), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (D. Lange: PNPd 20131340-32006012013P7; and E. S. Calixto), and Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (PACCSSFAPEMIG/CAPES Proc. FAPEMIG CRA-30058/12) for financial support.

6 References

- Agrawal, A.A., 2007. Macroevolution of plant defense strategies. *Trends Ecol. Evol.* 22, 103–109.
- Agrawal, A.A., Fishbein, M., 2006. Plant defense syndromes. *Ecology* 87, 132–149.
- Agren, J., Schemske, D.W., 1993. The cost of defence against herbivores: an experimental study of trichome production in *Brassica rapa*. *Am. Nat.* 141, 338–350.
- Alves-Silva, E., Bächtold, A., Barônio, G.J., Torezan-Silingardi, H.M., Del-Claro, K., 2014. Ant-herbivore interactions in an extrafloral nectaried plant: are ants good plant guards against curculionid beetles? *J. Nat. Hist.*, 1–11, <http://dx.doi.org/10.1080/00222933.2014.954020> (ahead-of-print).
- Appolinario, V., Schiavini, I., 2002. Levantamento fitossociológico de espécies arbóreas de Cerrado (*stricto sensu*) em Uberlândia Minas Gerais. *Bol. Do Herbário Ezechias Paulo Heringer* 10, 57–75.
- Assunção, M.A., Torezan-Silingardi, H.M., Del-Claro, K., 2014. Do ant visitors to extrafloral nectaries of plants repel pollinators and cause an indirect cost of mutualism? *Flora* 2, 4–249.
- Bächtold, A., Lange, D., Del-Claro, K., 2014. Influence, or the lack thereof, of host phenology, architecture and climate on the occurrence of *Udranomia spitzzi* (Hesperiidae: Lepidoptera). *Entomol. Sci.* 17, 66–74.
- Bascompte, J., 2009. Disentangling the web of life. *Science* 325, 416–419.
- Bascompte, J., 2010. Structure and dynamics of ecological networks. *Science* 329, 765–766.
- Blüthgen, N., Stork, N.E., Fiedler, K., 2004. Bottom-up control and co-occurrence in complex communities: honeydew and nectar determine a rainforest ant mosaic. *Oikos* 106, 344–358.

- Byk, J., Del-Claro, K., 2011. Ant–plant interaction in the neotropical savanna: direct beneficial effects of extrafloral nectar on ant colony fitness. *Popul. Ecol.* 53, 327–332.
- Choate, B.A., Lundgren, J.G., 2013. Why eat extrafloral nectar? Understanding food selection by *Coleomegilla maculata* (Coleoptera: Coccinellidae). *BioControl* 58, 359–367.
- Coley, P.D., Aide, T.M., 1991. Comparison of herbivory and plant defenses in temperate and tropical broad-leaved forests. In: Price, P.W., Lewinsohn, T.M., Fernandes, G.W., Benson, W.W. (Eds.), *Plant-Animal Interactions: Evolutionary Ecology in Tropical and Temperate Regions*. John Wiley & Sons, New York, pp. 25–49.
- Coley, P.D., Barone, J.A., 1996. Herbivory and plant defenses in tropical forests. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 27, 305–335.
- Cook-Paton, S.C., Agrawal, A.A., 2014. Exotic plants contribute positively to biodiversity functions but reduce native seed production and arthropod richness. *Ecology* 95, 1642–1650.
- Crawley, M.J., 1983. *Herbivory, the Dynamics of Animal–plant Interactions*. Blackwell Science Publications, Oxford.
- Croteau, R., Kutchan, T.M., Lewis, N.G., 2000. Natural products (secondary metabolites). In: Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Am. Soc. of Plant Physiol., Rockville, MD, pp. 1250–1319.
- Dáttilo, W., Guimarães, P.R., Izzo, T.J., 2013. Spatial structure of ant–plant mutualistic networks. *Oikos* 122, 1643–1648.
- Davidson, D.W., Snelling, R.R., Longino, J.T., 1989. Competition among ants for myrmecophytes and the significance of plant trichomes. *Biotropica* 21, 64–73.
- Del-Claro, K., Berto, V., Réu, W., 1996. Effect of herbivore deterrence by ants on the fruit set of an extrafloral nectary plant, *Qualea multiflora* (Vochysiaceae). *J. Trop. Ecol.* 12, 887–892.
- Del-Claro, K., Guillermo-Ferreira, R., Almeida, E.M., Zardini, H., Torezan-Silingardi, H.M., 2013. Ants visiting the post-floral secretions of pericarpial nectaries in *Palicourea rigida* (Rubiaceae) provide protection against leaf herbivores but not against seed parasites. *Sociobiology* 60, 217–221.
- Del-Claro, K., Oliveira, P.S., 1999. Ant–homoptera interactions in a neotropical savanna: the honeydew-producing treehopper *Guayaquila xiphias* (Membracidae) and its associated ant fauna on *Didymopanax vinosum* (Araliaceae). *Biotropica* 31, 135–144.

- Del-Claro, K., Torezan-Silingardi, H.M., 2009. Insect–plant interactions: new pathways to a better comprehension of ecological communities in neotropical savannas. *Neotrop. Entomol.* 38, 159–164.
- Ehrlich, P.R., Raven, P.H., 1964. Butterflies and plants: a study in coevolution. *Evolution* 18, 586–608.
- Feeny, P., 1970. Seasonal changes in oak leaf tannins and nutrients as a cause of spring feeding by winter moth caterpillars. *Ecology* 51, 565–581.
- Ferreira, C.A., Torezan-Silingardi, H.M., 2013. Effects of floral herbivory on reproductive success in species of the genus *Banisteriopsis* (Malpighiaceae) in the Brazilian Cerrado. *Sociobiology* 60, 323–328.
- González-Teuber, M., Heil, M., 2009. Nectar chemistry is tailored for both attraction of mutualists and protection from exploiters. *Plant Signaling Behav.* 4, 809–813.
- Harper, J.L., 1989. The value of a leaf. *Oecologia* 80, 53–58.
- Karabourniotis, G., Fasseas, C., 1996. The dense indumentum with its polyphenol content may replace the protective role of the epidermis in some young xeromorphic leaves. *Can. J. Bot.* 74, 347–351.
- Kennedy, G.G., 2003. Tomato pest, parasitoids, and predators: tritrophic interactions involving the genus *Lycopersicon*. *Annu. Rev. Entomol.* 48, 51–72.
- Koptur, S., 1994. Floral and extrafloral nectars of neotropical *Inga* trees: a comparison of their constituents and composition. *Biotropica* 26, 276–284.
- Korndörfer, A.P., Del-Claro, K., 2006. Ant defense versus induced defense in *Lafoensia pacari* (Lythraceae), a myrmecophilous tree of the Brazilian cerrado. *Biotropica* 38, 786–788.
- Korndörfer, G.H., Datnoff, L.E., 1995. Adubação Com Silício: Uma Alternativa No Controle De Doenças Da Cana-de-açúcar E De Arroz, 70. *Informações Agronômicas*, Piracicaba, pp. 1–5.
- Kursar, T.A., Coley, P.D., 2003. Convergence in defense syndromes of young leaves in tropical rainforests. *Biochem. Syst. Ecol.* 31, 929–949.
- Lange, D., Del-Claro, K., 2014. Ant–plant interaction in a tropical savanna: may the network structure vary over time and influence on the outcomes of associations? *PLoS ONE* 9, e105574.

- Lange, D., Dáttilo, W., Del-Claro, K., 2013. Influence of extrafloral nectary phenology on ant–plant mutualistic networks in a neotropical savanna. *Ecol. Entomol.* 38, 463–469.
- Levin, D.A., 1973. The role of trichomes in plant defense. *Quart. Rev. Biol.*, 3–15.
- Maffei, M., Chialva, F., Sacco, T., 1989. Glandular trichomes and essential oils in developing peppermint leaves. *New Phytol.* 111, 707–716.
- Marazzi, B., Bronstein, J.L., Koptur, S., 2013. The diversity: ecology and evolution of extrafloral nectaries: current perspectives and future challenges. *Ann. Bot.* 111, 1243–1250.
- Marquis, R.J., Ricklefs, R.E., Abdala-Roberts, L., 2012. Testing the low latitude/high defense hypothesis for broad-leaved tree species. *Oecologia* 169, 811–820.
- McNaughton, S.J., Tarrants, J.L., McNaughton, M.M., 1985. Silica as a defense against herbivory and a growth promotor in African grasses. *Ecology* 2, 528–535.
- Nahas, L., Gonzaga, M.O., Del-Claro, K., 2012. Emergent impacts of ant and spider interactions: herbivory reduction in a tropical savanna tree. *Biotropica* 44, 498–505.
- Nascimento, E.A., Del-Claro, K., 2010. Ant visitation to extrafloral nectaries decreases herbivory and increases fruit set in *Chamaecrista debilis* (Fabaceae) in a neotropical savanna. *Flora* 205, 754–756.
- Nogueira, A., Rey, P.J., Lohmann, L.G., 2012. Evolution of extrafloral nectaries: adaptive process and selective regime changes from forest to savanna. *J. Evol. Biol.* 25, 2325–2340.
- Oliveira, P.S., Leitão-Filho, H.F., 1987. Extrafloral nectaries: their taxonomic distribution and abundance in the woody flora of Cerrado vegetation in Southeast Brazil. *Biotropica* 19, 140–148.
- Peeters, P.J., 2002. Correlations between leaf structural traits and the densities of herbivorous insect guilds. *Biol. J. Linn. Soc.* 77, 43–65.
- Pereira, M.F., Trigo, J.R., 2013. Ants have a negative rather than a positive effect on extrafloral nectaried *Crotalaria pallida* performance. *Acta Oecol.* 51, 49–53.
- Pérez-Estrada, L.B., Canto-Santana, Z., Oyama, K., 2000. Variation in leaf trichomes of *Wigandia urens*: environmental factors and physiological consequence. *Tree Physiol.* 20, 629–632.
- Pires, L.P., Del-Claro, K., 2014. Variation in the outcomes of an ant-plant system: fire and leaf fungus infection reduce benefits to plants with extrafloral nectaries. *J. Insect Sci.* 14, 1–10.

- Raupp, M.J., 1985. Effects of leaf toughness on mandibular wear of the leaf beetle, *Plagiodera versicolora*. *Ecol. Entomol.* 10, 73–79.
- Rico-Gray, V., Oliveira, P.S., 2007. *The Ecology and Evolution of Ant–Plant Interactions*. The University of Chicago Press, Chicago.
- Rosenthal, G.A., Berenbaum, M.R., 1992. Herbivores: their interaction with secondary plant metabolites. In: *Ecological and Evolutionary Processes*. Academic Press, London.
- Schaller, A., 2008. *Induced Plant Resistance to Herbivory*. Springer, Netherlands.
- Stamp, N.E., Bowers, M.D., 1990. Phenology of nutritional differences between new and mature leaves and its effect on caterpillar growth. *Ecol. Entomol.* 15, 447–454.
- Styrsky, J.D., Kaplan, I., Eubanks, M.D., 2006. Plant trichomes indirectly enhance tritrophic interactions involving a generalist predator: the red imported fire ant. *Biol. Control* 36, 375–384.
- Thompson, J.N., 2009. The coevolving web of life. *Am. Nat.* 173, 125–140 (American Society of Naturalists Presidential Address).
- Thompson, J.N., 2013. *Relentless Evolution*. University of Chicago Press, Chicago.
- Tian, D., Tooker, J.F., Peiffer, M., Chung, S., Felton, G.W., 2012. Role of trichomes in defense against herbivores: comparison of herbivore response to woolly and hairless trichome mutants in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Planta* 236, 1053–1066.
- Varanda, E.M., Barosela, J.R., Oki, Y., Pais, M.P., Cerri, A., 2005. Relações entre plantas e insetos no Cerrado Pé-de-Gigante. In: Pivelho, V.R., Varanda, E.M. (Eds.), *O Cerrado Pé-de-Gigante*. Parque Estadual de Vassununga. Secretaria de Estado do Meio Ambiente, pp. 198–208.
- Vilela, A.A., Torezan-Silingardi, H.M., Del-Claro, K., 2014. Conditional outcomes in ant–plant–herbivore interactions influenced by sequential flowering. *Flora* 209, 359–366.
- Wäckers, F.L., Zuber, D., Wunderlin, R., Keller, F., 2001. The effect of herbivory on temporal and spatial dynamics of foliar nectar production in cotton and castor. *Ann. Bot.* 87, 365–370.
- Weinhold, A., 2012. Trichomes in plant herbivore interactions: the first line of defense of the wild tobacco *Nicotiana attenuata* attacking against insects. In: *PhD Thesis*. Friedrich-Schiller-Universität Jena. Biologisch-Pharmazeutische Fakultät.
- Werker, E., 2000. Trichome diversity and development. *Adv. Bot. Res.* 31, 1–35.

- Werker, E., Putievsky, E., Ravid, U., Dudai, N., Katzir, I., 1993. Glandular hairs secretory cavities, and the essential oil in developing leaves of *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae). *Ann. Bot.* 71, 43–50.
- Woodman, G.W., Fernandes, G.W., 1991. Differential mechanical defence: herbivory, evapotranspiration, and leaf-hairs. *Oikos* 60, 11–19.

Capítulo 2

Produtividade dos nectários extraflorais e o forrageamento de formigas em *Qualea multiflora* (Vochysiaceae) pós-simulação de herbivoria: uma abordagem sobre Defesa Induzida e Teoria da Defesa Ótima¹

¹ - A confecção deste capítulo não está nas normas da ABNT, pois os autores pretendem publicar o capítulo em revista internacional, a qual apresenta suas próprias normas editoriais.

Produtividade dos nectários extraflorais e o forrageamento de formigas em *Qualea multiflora* (Vochysiaceae) pós-simulação de herbivoria: uma abordagem sobre Defesa Induzida e Teoria da Defesa Ótima

Resumo

Plantas apresentam um complexo sistema de defesa contra herbívoros, sendo a defesa biótica promovida pelos nectários extraflorais (NEFs) um excelente exemplo. Nesse estudo, foram analisados a produtividade dos NEFs e o forrageamento de formigas em *Qualea multiflora* (Vochysiaceae) pós-simulação de herbivoria, abordando duas teorias: defesa induzida de plantas e teoria da defesa ótima. Para a análise da defesa induzida, foi simulada a herbivoria com cortes em folhas e em flores separadamente; e para teoria da defesa ótima, foi mensurada a abundância e riqueza de formigas e a produtividade de NEFs localizados nas folhas e nas inflorescências. Os resultados mostram que a simulação de herbivoria aumenta a produtividade dos NEFs em folhas e em flores e, conseqüentemente, um aumento na abundância de formigas. Além disso, a produtividade dos NEFs localizados em inflorescências é maior que do que os NEFs localizados nas folhas, independente se sofreram ou não herbivoria. Portanto, percebe-se que *Q. multiflora* apresenta defesa induzida a partir do aumento da produtividade dos NEFs pós-simulação de herbivoria e também corrobora as afirmações feitas pela teoria da defesa ótima, na qual estruturas com maior valor e probabilidade de ataque, nesse caso as flores, são mais protegidas.

Palavras-Chave: Cerrado, Defesa biótica, Inflorescência.

Abstract

Plants have a complex system defense against herbivores, where biotic defense provided by extrafloral nectaries (EFNs) an excellent example. In this study, we evaluated the EFNs productivity and ants foraging in *Qualea multiflora* (Vochysiaceae) post-simulation of herbivory, addressing two theories: induced defense of plants and optimal defense theory. For the analysis of induced defense, it was simulated herbivory in leaves and flowers with cuts, separately; for optimal defense theory, it was measured the abundance and richness of ants and EFNs productivity located in leaves and in inflorescences. Herbivory simulation increases EFNs productivity in leaves and flowers and in the abundance and richness of ants. Furthermore, EFNs productivity in inflorescences is greater than in leaves, regardless of herbivory. Therefore, *Q. multiflora* presents induced defense from increase EFNs productivity post-simulation of herbivory and corroborates the optimal defense theory statements, in which structures with greater value and likelihood of attack (*e.g.* flowers) are more protected.

Keywords: Savanna, Biotic defense, Inflorescence.

1 Introdução

As defesas das plantas estão relacionadas à detecção e diminuição dos danos causados por herbívoros (Feeny, 1976; Rhoades e Cates, 1976). Segundo Kursar e Coley (2003), mais de 50% dos organismos da Terra são representados pelas plantas e herbívoros e as interações entre esses dois grupos apresentam consideráveis implicações para os processos ecológicos e evolutivos. Essas interações são particularmente importantes nas regiões tropicais, onde existem maiores taxas de herbivoria e maior investimento em defesas pelas plantas quando comparadas às regiões temperadas (Levin e York, 1978; Coley e Aide, 1991; Basset, 1994; Marquis e Braker, 1994). Independente do local onde essas interações ocorrem, plantas e herbívoros estão em uma contínua corrida evolutiva – *i.e.* coevolução (Ehrlich e Raven, 1964; Thompson, 2005, 2013; Marquis et al., 2012). Nesse processo, uma ampla variedade de defesas anti-herbívoros surgiram (Ehrlich e Raven 1964; Agrawal et al. 2009; Mortensen, 2013) e, portanto, formas de caracterizar e classificar essas defesas também, sendo elas: defesas constitutivas – aquelas que estão presentes e expressas na planta, representando a primeira linha de defesa (*e.g.* metabólitos secundários, espinhos); e defesas induzidas – aquelas que são produzidas após algum dano ou risco de dano, representando a segunda linha de defesa das plantas (*e.g.* nectários extraflorais - NEFs) (Zangerl e Rutledge, 1996; Karban e Baldwin, 1997).

As primeiras descrições de defesas induzidas de plantas foram feitas na década de 1970 com os estudos de Benz (1974), Haukioja e Hakala (1975) e Verde e Ryan (1972). A partir de então, pesquisadores têm evidenciado que elas são extremamente dispersas (Karbon e Baldwin, 1997) e podem produzir grandes efeitos sobre as populações e comunidades de herbívoros (Karbon e Carey, 1984; Thaler et al., 2001; Underwood e Rausher, 2002; Ohgushi, 2008). Isso porque as populações de herbívoros são temporalmente e espacialmente variáveis dentro e entre comunidades (Lowman, 1985) e, desta maneira, os danos causados por eles podem ser imprevisíveis. Alguns trabalhos têm mostrado que após o ataque de herbívoros, plantas aumentam os níveis de defesas químicas (Baldwin, 1991), físicas (Obeso, 1997), e bióticas (Ness, 2003; Pulice e Packer, 2008), o que pode afetar negativamente vertebrados (Seldal e Andersen, 1994), patógenos (Schneider et al., 1996) e insetos herbívoros (Karbon, 1993; Stoutand e Duffey, 1996). Projetos com manipulações genéticas têm fornecido evidências dos vários mecanismos bioquímicos e vias de sinalização no processo de indução (*e.g.* Baldwin e Preston, 1999; Zavala et al., 2004; Paschold et al., 2007). As respostas induzidas das plantas à herbivoria são análogas às respostas imunes de animais e apresentam como objetivo a redução do desempenho e/ou da preferência dos herbívoros a partir de modificações na sua composição química e/ou na qualidade de seus tecidos (Baldwin e Schultz, 1983; Karban e Myers, 1989; Karban e Baldwin, 1997; Agrawal, 1998; Korndörfer e Del-Claro, 2006).

O estudo dos padrões de defesa anti-herbivoria é uma área que compreende diversas

hipóteses e teorias (Stamp, 1992). Desde 1970, várias teorias abordando diversos temas relacionados às defesas das plantas surgiram [e.g. restrição de desenvolvimento e fisiologia (Bryant et al., 1983; Coley et al., 1985), o valor dos tecidos (McKey, 1974, 1979), a aparência para os herbívoros (Fenny, 1976, Rhoades e Cates, 1976)], com o propósito de explicar a distribuição dos metabólitos secundários observados nas plantas. Uma das teorias mais influentes é a Teoria da Defesa Ótima (em inglês *Optimal Defense Theory*; TDO), a qual foi inicialmente descrita por McKey (1974, 1979) e Rhoades (1979). Essa teoria afirma que, no que diz respeito às interações planta-herbívoro, para minimizar os custos e maximizar as defesas perante os herbívoros, as defesas devem ser empregadas nas partes da planta em proporção direta ao seu valor (tecidos relacionados ao *fitness* da planta) e probabilidade de ataque.

A interação entre formigas e plantas com NEFs é um modelo clássico de mutualismo e muito comum nas savanas brasileiras (Del-Claro, 2004; Rico-Gray e Oliveira, 2007). Os NEFs estão diretamente envolvidos nas interações formiga-planta-herbívoro (Rico-Gray e Oliveira, 2007; Del-Claro e Torezan-Silingardi, 2009; Lange et al., 2013), através da oferta de um líquido rico em carboidratos e outros compostos diluídos (Gonzalez-Teuber e Heil, 2009), que atraem diversos predadores e parasitóides (Koptur, 2005; Marazzi et al., 2013). Vários estudos constataram uma relação positiva entre plantas que apresentam NEFs e a presença de formigas, diminuindo a taxa de herbivoria e aumentando o sucesso reprodutivo das plantas (ver revisão em Rico-Gray e Oliveira, 2007; Rosumek et al., 2009). Entretanto, outros autores têm mostrado que o resultado dessa interação nem sempre representa um benefício mútuo (ver O'Dowd e Catchpole, 1983; Byk e Del-Claro, 2010; Nogueira et al., 2012; Assunção et al., 2014; Lange e Del-Claro, 2014; Hanna et al., 2015), podendo variar no tempo e no espaço (O'dowd e Catchpole, 1983; Rico-Gray, 1993; Bronstein, 1998; Del-Claro, 2004; Lange e Del-Claro, 2014).

Atualmente, é possível encontrar na literatura vários estudos que exploraram a interação entre formigas e plantas com NEFs, focando, principalmente, no efeito dessa interação sobre a herbivoria foliar e suas consequências para os tecidos reprodutivos da planta (Nascimento e Del-Claro, 2010; Nahas et al., 2012). Nesses casos, os NEFs são extremamente ativos em folhas jovens, as quais são mais vulneráveis aos danos causados por herbívoros (Heil et al., 2000; Korndörfer e Del-Claro, 2006). À medida que a folha se desenvolve, começa a adquirir defesas físicas, tais como celulose, lignina e sílica (ver Varanda et al., 2005; Korndörfer e Del-Claro, 2006; Calixto et al., 2015) e a secreção de néctar diminui. Entretanto, sabe-se que algumas espécies de plantas apresentam NEFs em frutos (Rico-Gray, 1989; Díaz-Castelazo et al., 2005; Holland et al., 2010; Falcão et al., 2014), nas sépalas e nos próprios botões florais (nectários pericarpiais) e inflorescências (ver Oliveira e Leitão-Filho, 1987; Del-Claro et al., 2013). Como essas estruturas, partes reprodutivas e dispersoras, estão diretamente relacionadas com o sucesso reprodutivo da

planta (Holland et al., 2009) e uma quantidade significativa de energia é alocada para essas partes, tais estruturas adquirem um valor alto para a planta (Cousens et al., 2008).

De acordo com as teorias de defesa induzida e a de Defesa Ótima, espera-se que os NEFs localizados tanto em estruturas reprodutivas quanto em estruturas vegetativas alterem sua produtividade em resposta à simulação de herbivoria e espera-se que a presença e a qualidade do néctar dos NEFs presentes em partes reprodutivas e dispersoras da planta (*e.g.* flores e/ou inflorescências) seja mais atrativo para predadores, como as formigas, do que em partes com menor valor e probabilidade de ataque (*e.g.* folhas), minimizando os custos e maximizando os benefícios. Desta maneira, o presente capítulo teve como objetivo verificar se plantas são mais sensíveis aos ataques de herbívoros em partes reprodutivas que em partes não reprodutivas (vegetativas), aumentando a produtividade dos NEFs e, consequentemente, o recrutamento de formigas em estruturas ou áreas específicas das plantas. Para isso, foram elaboradas as seguintes questões: (i) os NEFs de partes vegetativas e reprodutivas aumentam sua produtividade em resposta à simulação de herbivoria? (ii) o forrageamento de formigas é alterado após a simulação de herbivoria? (iii) os NEFs localizados em partes reprodutivas produzem mais néctar que os NEFs das partes vegetativas? (iv) Partes reprodutivas são mais protegidas do que partes vegetativas?

2 Material e Métodos

2.1 Área de estudo e espécie avaliada

O estudo foi realizado na Reserva Ecológica do Clube de Caça e Pesca Itororó de Uberlândia (CCPIU - 48°17' O; 18°58' S), em Uberlândia, MG. O município de Uberlândia está localizado no bioma Cerrado, o qual cobre aproximadamente 2 milhões de Km² e representa cerca de 22% da superfície terrestre do Brasil (Oliveira e Marquis, 2002). É a savana tropical mais diversa em fauna e flora, apresentando grande variação fitofisionômica (Oliveira e Marquis, 2002). Essa variação abrange desde áreas abertas, com esparsa cobertura de arbustos e pequenas árvores, até áreas mais fechadas, com árvores atingindo de 12 à 15 metros de altura (Ratter et al., 1997). De acordo com Köppen, o clima da região é subtropical e Aw, o qual é caracterizado por verão chuvoso (de outubro a março) e inverno seco (de abril a setembro). A temperatura média anual varia de 18 a 28° C e a precipitação de 800 a 2.000 mm (Oliveira-Filho e Ratter, 2002).

Para este estudo, foi utilizada uma espécie de planta do Cerrado que possui NEFs, *Qualea multiflora* Mart. (Vochysiaceae), a qual apresenta hábito arbóreo decíduo, com folhagem no início da estação chuvosa (setembro), seguida pela floração em outubro e frutificação em dezembro. Essa espécie apresenta folhas pilosas e opostas e tronco liso acinzentado (Negrelle, 2011). Os NEFs são ovais e elevados, localizados em ambos os lados dos caules jovens, na base dos pecíolos das folhas

(Fig. 1a e 1c) e no pedúnculo floral (Fig. 1b), no qual as flores são reunidas em uma inflorescência terminal (ver mais detalhes em Machado et al., 2008). Essa espécie de planta foi escolhida por ser abundante na área de estudo (ver Appolinário e Schiavini, 2002) e apresentar NEFs em diferentes estruturas (vegetativas e reprodutivas).

2.2 Herbivoria Foliar

Essa etapa foi desenvolvida utilizando 45 plantas com características fenotípicas semelhantes (altura, número de galhos, desenvolvimento e idade das folhas) e distantes cinco metros entre si. Em cada indivíduo foi marcado um NEF (de folhas do meristema apical), o qual foi isolado com saco do tipo voal e faixa de resina Tanglefoot, evitando o acesso e a remoção do néctar por formigas e outros artrópodes e a diluição pela chuva e orvalho. As plantas foram divididas em três grupos de 15 indivíduos, selecionados aleatoriamente. No primeiro grupo não foi conduzido nenhum tipo de manipulação, sendo considerado o grupo sem herbivoria. Nos outros dois grupos de plantas foi simulada a herbivoria com o auxílio de uma tesoura, sendo que em um grupo houve a simulação de herbivoria através da remoção de 10% da área foliar de todas as folhas das plantas e, no outro, a remoção de 40%. A simulação de herbivoria foliar foi feita às 21:00 horas compreendendo o período de maior produtividade de néctar extrafloral dessa espécie de planta (Lange et al. em preparação). Posteriormente, o néctar produzido em todos os NEFs de todos os ramos selecionados, inclusive nos ramos das plantas sem herbivoria, foi coletado 1, 6 e 24 horas após a simulação, seguindo as avaliações de um em um dia até a necrose dos tecidos dos NEFs (Fig. 1d). Em cada avaliação a quantidade de néctar produzido e a porcentagem de açúcar dos mesmos foram medidos com o auxílio de microcapilar de 5 μ L graduado e refratômetro manual (modelo Eclipse®), respectivamente. Todos os nectários avaliados foram lavados com água destilada e secados com papel filtro após cada avaliação, para garantir que a produção do néctar fosse referente àquele período específico.

Durante o período de simulação de herbivoria, foi avaliada a abundância de formigas no momento de coleta do néctar, nos três grupos informados. Um indivíduo de cada espécie de formiga foi coletado, fixado em álcool 70% e identificado ao nível de espécie, com sua confirmação na Universidade Federal do Paraná, em Curitiba.

Figura 1. Nectários extraflorais ativos na folha (a e c) e na base da inflorescência (b); e (d) nectários extraflorais necrosados (setas em vermelho) em *Qualea multiflora* (Vochysiaceae). Fotos: Lange, D. e Calixto, E.S.

2.3 Herbivoria Floral

Para verificar como as plantas respondem aos ataques de herbívoros em partes reprodutivas, foram selecionados 30 indivíduos de *Q. multiflora*. Após a seleção das plantas, foi marcado um NEF da inflorescência de cada indivíduo, o qual também foi isolado da visita de formigas e de outros artrópodes. Em seguida, as plantas foram separadas aleatoriamente em dois grupos de quinze indivíduos: o primeiro grupo foi o grupo sem herbivoria, ou seja, sem manipulação experimental; o segundo foi o grupo tratamento, onde ocorreu a simulação de herbivoria em todas as inflorescências da planta, com cortes feitos com o auxílio de uma tesoura. Todos os botões e flores já abertas das inflorescências tiveram 10% de suas estruturas cortadas (removidas). A simulação de herbivoria também foi feita às 21:00 horas.

O néctar produzido em todos os NEFs de todas as inflorescências marcadas foi coletado 1, 6, e 24 horas após a simulação, seguindo as avaliações de um em um dia até a necrose dos mesmos, sendo medidas em cada avaliação a quantidade de néctar produzido e a porcentagem de sacarose (idem ao subtópico 2.2 Herbivoria Foliar). Após cada análise, o NEF foi lavado com água destilada e

secado com papel filtro, para garantir que a produção de néctar fosse referente àquele período específico. O estudo da comunidade de formigas foi realizado da mesma maneira que no subtópico anterior, assim como a coleta e identificação das formigas.

Os resultados obtidos nessa etapa foram comparados com os da etapa anterior (subtópico 2.2 Herbivoria Foliar) para verificar possível diferença na resposta induzida dos NEFs de partes reprodutivas e vegetativas.

2.4 Análise dos dados

2.4.1 Transformação em Calorias

A partir dos dados de volume e concentração do néctar de cada solução retirada dos NEFs, foi calculada a concentração de açúcar da solução (equivalentes de sacarose), correspondendo à quantidade em miligramas (mg) de açúcar por microlitros (μL), como proposto por Bolten et al. (1979). Esse cálculo foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Dafni et al. (2005), utilizando a seguinte equação: $y = 0,00226 + (0,00937 x) + (0,0000585 x^2)$, sendo “x” o valor da concentração (a leitura do refratômetro) e “y” a quantidade de açúcares totais em $1\mu\text{L}$. Posteriormente, multiplicou-se o total de açúcar em cada solução de néctar (em mg totais de açúcar) pelo volume (em μL) da solução coletada, e em seguida, multiplicou-se esse valor por quatro, correspondendo ao valor energético da solução em calorias (i.e. cada 1 mg de açúcar é equivalente à quatro calorias) (Dafni et al., 2005). Quando os nectários apresentaram volume muito baixo (menor ou igual a $0,1\mu\text{L}$), não foi possível mensurar a concentração da solução. Nesses casos, somente foi utilizado o valor de volume para as análises.

2.4.2 Herbivoria Foliar

Para comparar o volume e as calorias no néctar dos NEFs entre os grupos (sem herbivoria, 10% de simulação de herbivoria e 40%), foi utilizada Análise de Variância (Anova) com teste a posteriori de Tukey, após os dados de volume e calorias serem transformados em $\text{Log}(x+1)$ para atingir normalidade, já que os dados apresentaram assimetria positiva severa (ver Zar, 2010). A comparação da abundância total de formigas entre os três grupos de plantas foi feita pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (H) com teste a posteriori de Dunn.

Para comparar se houve variação no volume de néctar e abundância de formigas entre os horários analisados de cada grupo de plantas, foi utilizado o teste não paramétrico de Friedman e, quando necessário, o teste de Comparação Múltipla de Friedman. Não foi feita análise estatística para verificar diferença na quantidade de calorias produzidas entre os horários avaliados, pois alguns horários apresentaram muitos valores nulos de produtividade.

2.4.3 Herbivoria Floral

Para comparar o volume de néctar dos NEFs presentes nas inflorescências entre o grupo

controle e com simulação de herbivoria, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney, pois os dados não atingiram normalidade. Para calorías e abundância de formigas foi utilizado o teste paramétrico t de Student (t).

Para comparar se houve variação no volume de néctar e abundância de formigas entre os horários analisados de cada grupo, foi utilizado o teste não paramétrico de Friedman (F) e, quando significativo, o teste de Comparação Múltipla de Friedman. Não foi feita análise com calorías, pois alguns horários apresentaram muitos valores nulos de produtividade.

2.4.4 Herbivoria Foliar *versus* Herbivoria Floral

Nesta etapa foram utilizados apenas quatro grupos de plantas: sem herbivoria foliar, sem herbivoria floral, 10% de simulação de herbivoria foliar e 10% de simulação de herbivoria floral. Tanto para volume, calorías e abundância de formigas foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (H) com teste a posteriori de Conover-Inman ao nível de 5% de probabilidade.

3 Resultados

3.1 Herbivoria Foliar

3.1.1 Volume de néctar

Plantas produziram maior volume de néctar extrafloral após simulação de herbivoria de 10% e 40% comparado com plantas que não sofreram herbivoria ($F_{[2,44]}=12,242$; $p<0,001$; Fig.2). As plantas com 40% de herbivoria foram as que apresentaram maior volume ($3,14 \pm 1,63$; média $\pm$ desvio padrão), seguidas pelas plantas com 10% ($2,37 \pm 2,38$) e, por fim, pelas plantas sem herbivoria ($0,92 \pm 0,78$).

Figura 2. Volume de néctar foliar em *Qualea multiflora* (Vochysiaceae) nos três diferentes grupos de plantas (sem herbivoria, plantas com 10%, e plantas com 40% de simulação de herbivoria). As barras representam os valores médios com o desvio padrão. $F_{[2,44]}=12,242$; $p<0,001$. Letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. ^a – Os dados estão representados por Log (x+1).

Também foi observado que cada grupo de plantas produziu diferente volume de néctar extrafloral nos horários avaliados (Friedman_[5,89]=48,30, $p<0,001$, Fig. 3a – para o grupo sem herbivoria; Friedman_[5,89]=35,50, $p<0,001$, Fig. 3b – para o grupo de plantas que tiveram 10% da área foliar removida; e Friedman_[5,89]=48,93, $p<0,001$, Fig. 3c – para o grupo de plantas que tiveram 40% da área foliar removida). Plantas do grupo sem herbivoria produziram maiores valores 24 e 48 h após o início das observações. Plantas que tiveram 10% e 40% da área foliar de suas folhas removidas produziram maior volume de néctar extrafloral 24 h e 48 h após a simulação, respectivamente.

Figura 3. Volume de néctar foliar em *Qualea multiflora* (Vochysiaceae) nas plantas do grupo (a) sem herbivoria, (b) 10% e (c) 40% de simulação de herbivoria, após o momento do dano. As barras representam os valores de mediana e interquartil. Sem herbivoria (Friedman_[5,89]=48,30; $p<0,001$; Fig. 3a), 10% de simulação de herbivoria (Friedman_[5,89]=35,50; $p<0,001$; Fig. 3b), e 40% de simulação de herbivoria (Friedman_[5,89]=48,93; $p<0,001$; Fig. 3c). Letras diferentes diferem entre si pelo teste de Comparação Múltipla de Friedman ao nível de 5% de probabilidade.

3.1.2 Calorias no néctar

O néctar extrafloral dos grupos de plantas (sem herbivoria, 10% e 40% de simulação de herbivoria) apresentaram diferentes quantidades de calorias ($F_{[2,44]}=16,39$; $p<0,001$; Fig. 4).

As plantas com 40% de simulação de herbivoria foram as que apresentaram maior valor energético ($12,89 \pm 9,03$; média $\pm$ desvio padrão), seguidas pelas plantas com 10% ($6,20 \pm 8,09$) e, por fim, pelas plantas sem herbivoria ($1,34 \pm 1,17$). A média e o desvio padrão da quantidade de calorias produzida em todos os horários de coleta nos três grupos de plantas estão representados na Figura 5.

Figura 4. Calorias presentes no néctar extrafloral em *Qualea multiflora* (Vochysiaceae) nos três diferentes grupos de plantas (sem herbivoria, plantas com 10% e plantas com 40% de simulação de herbivoria). As barras representam os valores médios com o desvio padrão. $F_{[2,44]}=16,39$; $p<0,001$. Letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. ^a – Os dados estão representados por $\text{Log}(x+1)$.

Figura 5. Calorias presentes no néctar foliar em *Qualea multiflora* (Vochysiaceae) em todos os horários de coleta nas plantas do grupo (a) sem herbivoria (sem manipulação experimental), (b) 10% e (c) 40% de simulação de herbivoria, após o momento do dano. As barras representam os valores de média e desvio padrão.

3.1.3 Formigas

Formigas foram mais abundantes em plantas que tiveram área foliar removida comparado ao grupo de plantas sem herbivoria ($H=15,09$; $GL=2$; $p<0,001$; Fig. 6). O grupo sem herbivoria apresentou $2,4 \pm 3,41$ (média $\pm$ desvio padrão) formigas por planta; o grupo de plantas com simulação de herbivoria de 10% apresentou $10,6 \pm 8,27$ formigas por planta; e o grupo de plantas com simulação de herbivoria de 40% apresentou $9,2 \pm 6,39$ formigas por planta. Isso significa que houve um aumento de 4,3 e 3,8 vezes no número de formigas por planta nos grupos com simulação de herbivoria de 10% e 40%, respectivamente, comparado com o valor do grupo sem herbivoria.

A abundância de formigas em plantas que não sofreram simulação de herbivoria não variou entre os horários observados ($F_{[6,104]}=7,429$; $p=0,283$; Fig. 7a). Em contrapartida, tanto para o grupo com simulação de herbivoria de 10% como para o grupo com simulação de herbivoria de

40%, houve diferença significativa entre os horários analisados após a simulação de herbivoria (Friedman_[6,104]=21,99; $p<0,001$; Fig. 7b; e Friedman_[6,104]=20,81; $p<0,01$; Fig. 7c; respectivamente).

Figura 6. Abundância de formigas em *Qualea multiflora* (Vochysiaceae) nos três diferentes grupos de plantas (sem herbivoria, plantas com 10% e plantas com 40% de simulação de herbivoria). $H=15,09$; $GL=2$; $p<0,001$. As barras representam os valores de mediana e interquartil. Letras diferentes diferem entre si pelo teste de Dunn ao nível de 5% de probabilidade.

Figura 7. Abundância de formigas em *Qualea multiflora* (Vochysiaceae) nas plantas do grupo (a) sem herbivoria, (b) 10% (Friedman_[6,104]=21,99; $p<0,001$) e (c) 40% de simulação de herbivoria (Friedman_[6,104]=20,81; $p<0,01$), após o momento do dano. As barras representam os valores de mediana e interquartil. Letras diferentes diferem entre si pelo teste de Comparação Múltipla de Friedman ao nível de 5% de probabilidade.

A abundância de formigas das plantas do grupo controle e dos grupos com 10% e 40% de simulação de herbivoria está representada nas Figuras 8a, 8b e 8c, respectivamente.

Figura 8. Abundância das espécies de formigas encontradas em plantas de *Qualea multiflora* (Vochysiaceae) do grupo (a) sem herbivoria, (b) 10% e (c) 40% de simulação de herbivoria, após o momento da simulação.

3.2 Herbivoria Floral

3.1.1 Volume de néctar

Os NEFs das inflorescências de plantas cujas flores sofreram simulação produziram mais néctar ($4,60 \pm 3,68$; média $\pm$ desvio padrão) comparados aos NEFs de plantas sem herbivoria floral ($1,47 \pm 0,99$) ($U=25,50$; $p<0,001$; Fig. 9).

Figura 9. Volume de néctar extrafloral das inflorescências de *Qualea multiflora* (Vochysiaceae) nos dois diferentes grupos de plantas (sem herbivoria e plantas com simulação de herbivoria). As barras representam valores de mediana com interquartil (U=25,50; $p<0,001$).

Ao comparar o volume secretado pelos NEFs entre os horários dentro do grupo sem herbivoria e do grupo com herbivoria, observou-se que existe diferença significativa nos dois grupos: sem herbivoria ($F_{[6,104]}=32,79$; $p<0,001$; Fig. 10a) e com herbivoria ($F_{[6,104]}=58,03$; $p<0,001$; Fig. 10b).

Figura 10. Volume de néctar extrafloral produzido nos NEFs das inflorescências de *Qualea multiflora* (Vochysiaceae) após o início das observações. (a) plantas sem herbivoria ($F_{[6,104]}=32,79$; $p<0,001$) e (b) plantas com herbivoria ($F_{[6,104]}=58,03$; $p<0,001$). As barras representam os valores de mediana e interquartil. Letras diferentes diferem entre si pelo teste de Comparação Múltipla de Friedman ao nível de 5% de probabilidade.

3.1.2 Calorias no néctar

O néctar produzido pelos NEFs das inflorescências de plantas com simulação de herbivoria tiveram maior quantidade de calorias comparado ao néctar de plantas sem herbivoria ($t=2,070$; $p<0,05$; Fig. 11). As plantas com simulação de herbivoria apresentaram $7,63 \pm 11,21$ calorias (média $\pm$ desvio padrão dos dados não transformados) e plantas do grupo sem herbivoria $1,72 \pm 1,55$

calorias. A média e o desvio padrão da quantidade de calorias produzida em todos os horários de coleta no grupo sem herbivoria e no grupo com simulação de herbivoria estão representados na Figura 12.

Figura 11. Quantidade de calorias no néctar extrafloral das inflorescências de *Qualea multiflora* (Vochysiaceae) nos dois diferentes grupos de plantas (sem herbivoria e plantas com herbivoria floral simulada). As barras representam valores de média e desvio padrão. $t=2.070$; $p<0,05$. ^a – Os dados estão representados por $\text{Log}(x+1)$.

Figura 12. Calorias presentes no néctar foliar em *Qualea multiflora* (Vochysiaceae) em todos os horários de coleta nas plantas do grupo (a) sem herbivoria e nas plantas (b) com herbivoria, após o momento do dano. As barras representam os valores de média e desvio padrão.

3.1.3 Formigas

A abundância de formigas foi maior em plantas com herbivoria ($t=2.364$; $p<0,05$; Fig. 13). Plantas do grupo sem herbivoria apresentaram $5,8 \pm 6,3$ (média $\pm$ desvio padrão) formigas, enquanto que o grupo de plantas com herbivoria apresentou $10,2 \pm 4,7$ formigas. Isso indica que plantas após terem suas flores danificadas tiveram o dobro de formigas que plantas sem herbivoria.

Figura 13. Abundância das espécies de formigas em *Qualea multiflora* (Vochysiaceae) nos dois diferentes grupos de plantas (sem herbivoria e plantas com herbivoria floral simulada). As barras representam valores de média e desvio padrão. $t=2.364$; $p<0,05$.

A abundância de formigas no grupo sem herbivoria não variou entre os horários observados ($F_{[5,89]}=9,122$; $p=0,104$; Fig. 14a), assim como no grupo com herbivoria ($F_{[5,89]}=5,072$; $p=0,407$; Fig. 14b).

Figura 14. Abundância de formigas em *Qualea multiflora* (Vochysiaceae) nas plantas do grupo (a) sem herbivoria ($F_{[5,89]}=9,122$; $p=0,104$) e (b) com herbivoria ($F_{[5,89]}=5,072$; $p=0,407$), após o momento do dano. As barras representam os valores de média e desvio padrão.

A abundância de formigas das plantas do grupo sem herbivoria e do grupo com herbivoria está representada nas Figuras 15a e 15b, respectivamente.

Figura 15. Abundância das espécies de formigas em *Qualea multiflora* (Vochysiaceae) nas plantas do grupo (a) sem herbivoria e (b) com herbivoria, após o momento do dano. As barras representam os valores de média e desvio padrão.

3.3 Herbivoria Foliar versus Herbivoria Floral

3.3.1 Volume

Ao comparar os grupos de plantas sem simulação de herbivoria foliar, sem simulação de herbivoria floral, com simulação de herbivoria foliar (10%) e com simulação de herbivoria floral (10%), observou-se que existe diferença significativa no volume de néctar produzido ($H=26,56$; $p<0,001$; Fig. 16). O grupo que produziu maior volume de néctar foi o grupo com simulação de herbivoria floral, seguido pelo grupo com simulação de herbivoria foliar, grupo sem simulação de herbivoria floral e grupo sem simulação de herbivoria foliar. Padrão similar foi encontrado ao avaliar a quantidade de calorias entre os mesmos grupos ($H=9,337$; $p<0,05$; Fig. 17).

Figura 16. Volume de néctar extrafloral foliar e das inflorescências de *Qualea multiflora* (Vochysiaceae) nos dois diferentes grupos de plantas (sem herbivoria e plantas com herbivoria simulada). As barras representam valores de mediana com interquartil. $H=26,56$; $p<0,001$. Letras diferentes diferem entre si pelo teste de Conover-Inman ao nível de 5% de probabilidade.

Figura 17. Calorias presentes no néctar extrafloral foliar e das inflorescências de *Qualea multiflora* (Vochysiaceae) nos dois diferentes grupos de plantas (sem herbivoria e plantas com herbivoria simulada). As barras representam valores de mediana com interquartil. $H=9,337$; $p<0,05$. Letras diferentes diferem entre si pelo teste de Conover-Inman ao nível de 5% de probabilidade.

3.3.3 Formigas

A abundância de formigas também foi diferente entre os grupos de plantas ($H=18,970$; $p<0,001$; Fig. 18). O grupo que apresentou maior abundância de formigas foi o que sofreu simulação de herbivoria floral, seguido pelo grupo com simulação de herbivoria foliar, grupo sem herbivoria floral e grupo sem herbivoria foliar.

Figura 18. Abundância de formigas em *Qualea multiflora* (Vochysiaceae) nos dois diferentes grupos de plantas (sem herbivoria e plantas com herbivoria simulada). As barras representam valores de mediana com interquartil. $H=18,970$; $p<0,001$. Letras diferentes diferem entre si pelo teste de Conover-Inman ao nível de 5% de probabilidade.

4 Discussão

A herbivoria em *Qualea multiflora* induz aumento na produtividade de seus NEFs em folhas e em flores e, conseqüentemente, há um aumento na abundância de formigas. Além disso, a produtividade dos NEFs localizados em inflorescências é maior que do que os NEFs localizados nas folhas, independente se sofreram ou não herbivoria. Assim, percebe-se que essa espécie de planta apresenta defesa induzida a partir do aumento da produtividade dos NEFs pós-simulação de herbivoria, e também corrobora as afirmações feitas pela Teoria da Defesa Ótima, que estruturas com maior valor e probabilidade de ataque, nesse caso as flores, são mais protegidas.

4.1 Herbivoria Foliar e Floral

4.1.1 Volume e Calorias

As plantas que apresentaram simulação de herbivoria foliar e floral aumentaram a produtividade (volume e calorias) de seus NEFs. Esse resultado é uma prova da existência de defesa induzida em *Q. multiflora*.

O aumento do número ou da produtividade dos NEFs após sofrerem danos por herbívoros ou simulação de herbivoria em folhas e botões foi demonstrado também em outros estudos (Agrawal e Rutter, 1998; Mondor et al., 2006; Pulice e Packer, 2008). Heil et al. (2000) mostraram que após cortarem e perfurarem as folhas de *Macaranga tanarius* (L.) Muell. Arg. (Euphorbiaceae), houve um aumento na produtividade dos NEFs em ambos os tratamentos. Holland et al. (2009) mostraram que após simularem herbivoria com cortes de cerca de 10% em botões florais de *Pachycereus schottii* Engelm (Cactaceae), os NEFs localizados nas pontas das tépalas aumentaram a produtividade de néctar. Além desses exemplos, poucos estudos têm mostrado o funcionamento dos NEFs localizados em flores, inflorescências e/ou frutos (Rico-Gray, 1989; Díaz-Castelazo et al., 2005; Falcão et al., 2014) e, menos ainda, quando é feita simulação de herbivoria para analisar a taxa de secreção dos NEFs encontrados nessas regiões como defesa induzida (Zangerl e Rutledge, 1996; Wäckers e Bonifay, 2004; Holland et al., 2009). Ainda, neste estudo, foi observado que *Qualea multiflora* não precisa de um herbívoro para estimular uma resposta de seus NEFs. Esse resultado difere de outros trabalhos que mostram que algumas plantas podem desenvolver sistemas de reconhecimento de dano através de determinadas substâncias ou moléculas presentes na saliva ou nos ovos (Arimura et al., 2005, 2011; Carrillo et al., 2012).

O grupo de plantas que sofreu dano floral e os dois grupos de plantas que sofreram danos foliares aumentaram a produtividade dos NEFs tanto em volume quanto em calorias. Comparando-se os dois grupos de plantas que sofreram danos foliares, nota-se que os indivíduos que apresentaram a maior porcentagem de dano foliar (40%) foram os que apresentaram maior produtividade média após a simulação de herbivoria. Kwok e Laird (2012), estudando *Vicia faba* L. (Fabaceae),

mostraram que a severidade do dano é um fator relacionado à defesa induzida, ou seja, quanto maior o dano, maior o estímulo para a produção de defesa. Resultado semelhante foi evidenciado no presente estudo, pois a intensidade de 40% de dano foliar em *Q. multiflora* aumentou a produtividade dos NEFs comparado ao dano de 10%. Portanto, *Q. multiflora* consegue distinguir e reagir a diferentes intensidades de danos.

A variação na produtividade do néctar extrafloral, tanto volume quanto calorias, entre os horários dentro dos grupos com simulação de herbivoria (10% e 40%) pode estar relacionada ao tempo de resposta da planta. Como visto anteriormente, a produtividade dos NEFs pode aumentar após a simulação de herbivoria, corroborando a hipótese inicial deste trabalho de que NEFs presentes em folhas apresentam variação na produtividade em resposta à herbivoria. Além disso, pode ser visto nas Figuras (3b, 3c, 5b, 5c, 10b e 12b) que há um aumento na produtividade (volume e calorias) dos NEFs 24 e 48 horas após a simulação de herbivoria. O período de tempo existente entre a indução e reconhecimento do dano e a efetivação da resposta pode ser a explicação para esse resultado encontrado. Sabe-se que plantas produzem cascatas de sinalização após serem induzidas e/ou sofrerem danos, conduzindo a determinado tipo de defesa (Arimura et al., 2011, Carrillo et al., 2012). Esse período, que é o tempo de resposta ao dano, também chamado de *lag time* (Zangerl, 2003; Karban, 2011), pode representar uma desvantagem das defesas induzidas quando comparadas com as defesas constitutivas. O *lag time* é um “tempo de atraso”, isto é, o tempo que determinada defesa induzida demora a ser ativada após o primeiro contato com o herbívoro. Nesta visão, a planta apresenta um tempo de vulnerabilidade, que no presente estudo pode ser comparado ao tempo de 24 horas, já que pelas Figuras 3, 5, 10 e 12, observa-se claramente que o aumento da produtividade dos NEFs deu-se após 24 horas em relação ao momento da simulação de herbivoria. Zangerl (2003) ainda mostra em seu trabalho uma figura relacionada ao tempo da resposta induzida. Esse autor afirma que a resposta é dividida em três níveis: nível *lag* – que seria o tempo de atraso da resposta; nível *plateau* – que seria o período no qual a resposta está em pico de efetividade; e o nível *decay* – que seria o decaimento ou relaxamento da resposta [o termo “relaxamento” é encontrado no estudo de Karban (2011)]. Esse tipo de resposta foi evidenciado neste estudo em *Q. multiflora*. O período anterior ao de 24 horas após a simulação de herbivoria teve baixa produtividade (*lag*), no período entre 24 e 96 horas aconteceu o pico de efetividade (*plateau*), e no período após as 96 h a resposta começou a perder eficiência (*decay*). Vários outros estudos com resposta induzida também têm mostrado um período de atraso e um período de decaimento na resposta induzida de plantas para defesas contra herbivoria (para NEFs ver Ness 2003; Heil e Silva-Bueno, 2007; Jaber e Vidal, 2010; Jones e Koptur, 2015; para outras defesas induzidas ver Baldwin e Schultz, 1983; Young e Okello, 1998; Young et al., 2003; Gomez et al., 2010).

Além disso, a herbivoria ou, no caso desse estudo, a simulação de herbivoria, é constituída

por uma perda de área foliar (10 e 40%), a qual reduz a taxa de fotossíntese e de transpiração da planta, como mostrado por Womack (1984) e Flinn et al. (1990). Desse modo, a folha que sofreu um dano e, conseqüentemente, perdeu área fotossintetizante para a fabricação de fotossintatos, pode levar um período maior de tempo para a produção de néctar e, portanto, responder à injúria sofrida. Somado a isso, plantas são capazes de modificar rotas de translocação do floema e nutrir determinadas regiões que não produzem produtos fotossintéticos em quantidade suficiente, sendo que o dano é uma das maneiras de interferência nas rotas de translocação (Taiz e Zeiger, 2009). Portanto, espera-se que uma intensidade maior de dano leve mais tempo para apresentar uma resposta induzida do que um dano de menor intensidade, o que foi evidenciado no presente estudo. Plantas que sofreram maior intensidade de dano, 40%, apresentaram pico de resposta 48 horas após a simulação, enquanto plantas com menor intensidade de dano, 10%, apresentaram pico de resposta após 24 horas.

Plantas sem herbivoria também apresentaram variação na oferta de néctar, entretanto, essa oferta foi mais baixa do que nas plantas que sofreram simulação de herbivoria. Deve ser levado em consideração que o padrão de secreção dos nectários extraflorais e nectários florais pode ser geneticamente determinado (Mitchell, 2004; Leiss e Klinkhamer, 2005b) e também pode ser influenciado pelas condições micro e macroambientais (Koptur, 1992; Heil et al., 2000; Nicolson e Nepi, 2005; Mondor et al., 2006; Petanidou, 2007; Bixemann et al., 2011). Koptur (1992) mostrou que em ambientes chuvosos e úmidos, o néctar extrafloral pode ter apenas 5 a 10% de açúcar, mas em locais ensolarados e secos, a concentração pode exceder 50%. Bixemann et al. (2011) mostraram que a porcentagem de luminosidade e a presença de formigas podem aumentar a produção de néctar extrafloral em algumas espécies do gênero *Inga*, indicando que as plantas são capazes de responder a sinais abióticos e bióticos. Além disso, os autores ainda explicam que essa produtividade pode ser influenciada através de um mecanismo fonte-dreno, isto é, à medida que o néctar é retirado do dreno (no caso o NEF) pelas formigas, a fonte (no caso o floema) “reabastece” o nectário. Em um trabalho feito em *M. tanarius* por Heil et al. (2000), os autores mostraram que as plantas, nas quais o néctar foi removido regularmente dos NEFs, apresentaram maior produtividade do que em plantas que apresentaram um intervalo de tempo de coleta maior. As análises do presente estudo foram feitas 1, 6 e 24 horas após o momento de simulação, seguindo as avaliações diariamente até a necrose dos NEFs. Desta maneira, além de todos os fatores mencionados anteriormente, que podem influenciar na produtividade dos NEFs em plantas sem herbivoria, *Q. multiflora* pode apresentar um determinado padrão de secreção de néctar (ver Nicolson et al., 2007; Lange et al. em preparação), ou seja, apresentar determinado período do dia e determinado tempo para reabastecer o nectário, após o néctar ter sido coletado.

As plantas sem herbivoria, portanto, podem ter sido influenciadas por diversos fatores

bióticos e abióticos, bem como apresentarem determinada dinâmica de produção de néctar, conduzindo para variações entre os horários de coleta do mesmo. Por outro lado, plantas com simulação de herbivoria variam sua produtividade mais em resposta à simulação de herbivoria do que a outros fatores externos, uma vez que todas as plantas dos três grupos pertencem à mesma população, apresentam características fenológicas semelhantes, estão sob as mesmas condições climáticas e não houve remoção do néctar por artrópodes, como as formigas, já que os NEFs foram isolados.

4.1.2 Formigas

Notou-se que as plantas que sofreram simulação de herbivoria, tanto foliar quanto floral, apresentaram maior abundância de formigas quando comparadas às plantas dos grupos sem herbivoria. Tal fato pode ser relacionado à resposta à defesa induzida das plantas pela herbivoria. Um estudo feito por Bixemann et al. (2011) com plantas do gênero *Inga* mostrou que o aumento do volume e da concentração de néctar conduz a um aumento da visitação de formigas. Gonzáles-Teuber et al. (2012) mostraram que o aumento da concentração de nectários extraflorais artificiais aumenta a agressividade e o número de formigas, intervindo diretamente no seu padrão de forrageamento. E em um estudo mais recente, Jones e Koptur (2015), os autores mostraram que os danos foliares e, conseqüentemente, o aumento da produtividade dos NEFs, aumentam o número de formigas que atendem a espécie de planta *Senna mexicana* var. *chapmanii* (Fabaceae). Vários outros estudos mostraram que a quantidade e a qualidade do néctar extrafloral podem afetar e influenciar o comportamento de patrulha das formigas (Blüthgen et al., 2004; Rudgers, 2004; Rudgers e Gardener, 2004, Bronstein et al., 2006). Deste modo, observa-se que as formigas conseguem detectar o aumento na produtividade dos NEFs em *Q. multiflora*, após a simulação de herbivoria.

Em adição, pode ser verificado que o pico de abundância das formigas, tanto nas plantas com danos foliares quanto nas plantas com dano floral, foi no período entre 24 e 96 horas pós-simulação. Esse resultado está diretamente relacionado com o aumento da produtividade dos NEFs promovido pela simulação de herbivoria. Como observado, as defesas induzidas apresentam certa desvantagem quando comparadas às defesas constitutivas, que é o *lag time* (Zangerl, 2003; Karban, 2011). Após sofrerem o dano, as defesas induzidas são ativadas e existe um período de tempo entre a indução e a ação efetiva da resposta. Foi mostrado neste estudo que *Q. multiflora* apresenta *lag time* de 24 horas e que o período no qual a defesa (atratividade de formigas devido à secreção de néctar extrafloral) está mais ativa é entre 24 e 96 horas. Esse período de tempo é, especificamente, o mesmo em que se observa a maior abundância de formigas nas plantas com tratamento foliar e

floral. Portanto, após o aumento na quantidade e na qualidade do néctar extrafloral, o número de formigas também acompanha essa mudança, já que esse líquido pode representar um recurso chave para associações entre formigas e plantas, como observado nesse estudo.

Ao observar o forrageamento das formigas após a simulação de herbivoria foliar e floral no presente estudo, percebe-se que existe um pico de abundância entre 24 e 96 horas após a simulação de herbivoria. Entretanto, pode ser visto que antes desse período (1 e 6 horas após a simulação) já existe um pequeno aumento na abundância de formigas, quando comparado com o grupo sem simulação de herbivoria, tanto para plantas com simulação de herbivoria foliar, quanto para plantas com simulação de herbivoria floral. Esse resultado pode estar associado com a liberação dos compostos orgânicos voláteis (COVs) logo após a simulação de herbivoria, os quais podem ter atraído formigas de imediato. Alguns estudos têm mostrado que as plantas podem liberar voláteis imediatamente após sofrerem dano, sendo chamados de “voláteis de folha verde” (tradução de “Green-leaf volatiles”). Esses voláteis são liberados após o rompimento celular e, portanto, fornecem de maneira rápida, confiável e altamente móvel, sinais relacionados ao dano sofrido (Heil, 2009). Nesse estudo, não foi avaliada a liberação de COVs pós-simulação de herbivoria, entretanto, supõe-se que esse seja o principal fator do aumento da abundância de formigas antes do pico observado entre 24 e 96 horas.

Ao observar as Figuras 8 e 15, percebe-se que a abundância de formigas aumentou nas plantas com simulação de herbivoria, sendo que o principal grupo de formigas encontrado nas plantas pertence ao gênero *Camponotus*. Alguns estudos sobre interação formiga-planta elaborados no Cerrado também mostraram essa grande riqueza de formigas desse gênero (Del-Claro et al., 1996; Tavares et al., 2008; Sendoya et al., 2009; Lange e Del-Claro, 2014). Segundo Oliveira e Freitas (2004), a composição das espécies de formigas das assembleias do Cerrado é muito parecida, e as espécies do gênero *Camponotus* são as mais bem representadas durante o dia e a noite. Além disso, levantamentos sobre a riqueza de formigas em determinadas áreas têm mostrado que esse gênero é um dos mais representativos (Battistola et al., 2005; Chantarasawat et al., 2013) e que suas espécies são dominantes sobre plantas (ver Lange et al. 2013) e geralmente ocorrem em grande abundância (Hölldobler e Wilson, 1990; Del-Claro e Oliveira, 1999). Somado a essa representatividade, Aranda-Rickert et al. (2014) mostraram que espécies dominantes de alguns gêneros, por exemplo *Camponotus* e *Crematogaster*, normalmente constroem seus ninhos perto (menos de dois metros) ou no sistema radicular de plantas com nectários extraflorais que elas atendem (buscam recursos). Deste modo, a alta representatividade do gênero e locais de nidificação, bem como o aumento da oferta de recurso e sinais químicos liberados pela planta, são fatores que podem ter influenciado no elevado número e riqueza de espécies do gênero *Camponotus* nesse estudo.

Particularmente, uma espécie de formiga esteve presente nos cinco grupos de plantas analisados nesse estudo (Foliar: sem herbivoria, simulação de herbivoria de 10% e 40%; Floral: sem herbivoria e simulação de herbivoria de 10%): a *Camponotus renggeri* Emery, 1894. Era esperado que *Camponotus crassus* fosse a espécie mais presente, como vários trabalhos feitos no Cerrado, inclusive na área de estudo, mostraram (Korndörfer e Del-Claro, 2006; Nahas et al., 2012; Lange et al. 2013; Assunção et al., 2014; Lange e Del-Claro, 2014). No entanto, essa espécie de formiga não apresenta atividade noturna (comunicação pessoal) justificando, portanto, o fato de não ter sido encontrada nas plantas desse estudo no momento das análises, já que a coleta de dados ocorreu à noite. A alta representatividade de *C. renggeri* já foi mostrada em alguns estudos (Oliveira e Freitas, 2004; Quental et al., 2005). Tavares et al. (2008) evidenciaram, através da avaliação da comunidade de formigas epigéicas no Cerrado e em uma cultura de eucalipto, que *C. renggeri* foi a espécie de formiga mais representativa e dominante durante a noite.

Alguns autores têm demonstrado que o sucesso ecológico de formigas está relacionado à capacidade de ajustamento de suas estratégias de forrageamento por recursos às suas restrições ambientais (Hölldobler e Wilson, 1990). Por exemplo, a temperatura pode influenciar a escolha do horário de forrageamento de formigas (Cerdá et al., 1998). Essa separação temporal, devido às variações ecofisiológicas entre espécies de formigas, pode reduzir os comportamentos agonísticos interespecíficos com relação às fontes de alimento previsíveis (Hölldobler e Wilson, 1990; Albrecht e Gotelli, 2001). Outros estudos têm corroborado essa visão (Del-Claro e Oliveira, 1999; Blüthgen et al., 2004; Lange et al. em preparação).

Nessa perspectiva, nota-se que a abundância de formigas, bem como seu forrageamento, são influenciadas pela oferta de néctar extrafloral e, talvez, por outros fatores também alterados após a simulação de herbivoria foliar e floral em *Q. multiflora*. Além disso, o gênero *Camponotus* é mostrado como um grupo altamente representativo no Cerrado e, particularmente, em plantas extranectaríferas, onde as espécies desse gênero também podem ser altamente representativas durante o período noturno.

4.2 Herbivoria Foliar versus Herbivoria Floral

4.2.1 Volume e Calorias

Os NEFs localizados nas inflorescências são mais produtivos que os localizados nas folhas, independente da presença ou não de herbivoria nas estruturas próximas a eles. Esse resultado corrobora a hipótese inicial deste estudo e faz referência a TDO.

A maior produtividade de néctar (volume e calorias) e abundância de formigas no grupo sem simulação de herbivoria floral comparado com o grupo sem simulação de herbivoria foliar mostra

que flores são mais valiosas e mais protegidas que folhas, seguindo as premissas da TDO. Segundo Mckey (1979) e Zangerl e Bazzaz (1992), tecidos vegetativos são geralmente menos valiosos e relativamente mais fáceis de serem “substituídos”, enquanto que flores e frutos representam um alto valor, devido à sua ligação direta com o sucesso reprodutivo da planta, e podem ser, às vezes, insubstituíveis (Cipollini e Levey, 1997; Holland et al., 2009). Além disso, estruturas reprodutivas são muito mais prováveis de serem atacadas (Zangerl e Bazzaz, 1992) e baixos níveis de danos podem conduzir para o não desenvolvimento do fruto (Karban e Baldwin, 1997). Desta maneira, vários trabalhos têm mostrado que defesas constitutivas são empregadas em estruturas reprodutivas, e defesas induzidas são empregadas em estruturas vegetativas (Zangerl e Rutledge, 1996; Wäckers e Bonifay, 2004; Holland et al., 2009). Holland et al. (2009), em um trabalho com *Pachycereus schottii* (Cactaceae), observaram que a produção de néctar extrafloral em botões é induzida, mas em frutos não, visto que frutos apresentam maior valor para a planta do que botões, não apresentando, desta maneira, defesa induzida nessas estruturas. Wäckers e Bonifay (2004) mostraram que a produção de néctar extrafloral nas brácteas de *Gossypium hirsutum* (Malvaceae) não aumentou após indução, enquanto que a produtividade dos NEFs localizados nas folhas sim. Ainda nesse mesmo trabalho com *G. hirsutum*, foi visto que a produtividade dos NEFs localizados nas brácteas excede em muito a dos NEFs localizados nas folhas quando não há nenhum tipo de dano. Semelhante ao trabalho de Holland et al. (2009) e Wäckers e Bonifay (2004), o presente estudo mostrou que os NEFs localizados nas inflorescências de *Q. multiflora* produzem uma maior quantidade de néctar do que os NEFs localizados nas folhas mesmo quando nenhum dano é causado.

Além das partes reprodutivas apresentarem altas concentrações de nitrogênio e, portanto, serem valiosas para a planta (ver Cousens et al., 2008; McCall e Fordyce, 2010), a “substituição” das estruturas é outro fator determinante para que defesas constitutivas sejam empregadas nessas partes de alto valor. Segundo Nitao e Zangerl (1987), a substituição de folhas pode ser, e de fato é, dispendiosa para a planta. Porém, é possível substituir a perda após um dano, enquanto que a substituição de um fruto em desenvolvimento, frequentemente, não é. Portanto, é compreensível que a planta empregue defesas que sempre estão presentes em estruturas de alto valor e que podem ser insubstituíveis. Contudo, os NEFs localizados em inflorescências (parte reprodutiva da planta) de *Q. multiflora* parecem apresentar um padrão de defesa mais induzido do que constitutivo, diferente do que é mostrado em outros trabalhos. É predito que, se os investimentos em defesas constitutivas aumentam, os investimentos em defesas indutivas diminuem, o que leva a um tema muito discutido, que é o *trade-off* entre a produção desses dois tipos de defesa pela planta (Karban e Myers, 1989; Zangerl e Rutledge, 1996; Morris et al., 2006; Kessler, 2015). Segundo Holland et al. (2009), os NEFs são amplamente diversos e distribuídos, no entanto, os estudos para entender o custo de investimento em NEFs como uma defesa constitutiva ou induzida são muito recentes e não estão

muito claros.

Pode-se observar, portanto, que os NEFs de partes funcionalmente diferentes em *Q. multiflora* apresentam variação na secreção de néctar após serem induzidos por danos mecânicos e que, o NEF localizado na inflorescência, especificamente, representa uma defesa induzida e não constitutiva, como colocado por alguns estudos e teorias.

4.2.2 Formigas

Observa-se que a abundância de formigas em plantas com simulação de herbivoria foliar e floral foi maior que em plantas sem simulação de herbivoria. Além disso, plantas nas quais foram avaliados os NEFs localizados em inflorescências apresentaram maior abundância de formigas (ver figura 18). Esse resultado pode estar relacionado à maior produtividade dos NEFs. O néctar extrafloral secretado pelos NEFs localizados nas inflorescências deveria ser, e foi, mais atrativo do que o néctar secretado pelos NEFs foliares e, desta maneira, maior número de formigas foi atraído pelos NEFs de partes reprodutivas do que pelos NEFs de partes vegetativas, corroborando a predição da TDO e a hipótese inicial desse estudo.

Vários estudos mostraram que a quantidade e qualidade do néctar podem influenciar no comportamento de patrulha das formigas (Blüthgen et al., 2004; Bronstein et al., 2006; Bixemann et al., 2011; Gonzáles-Teuber et al., 2012). Byk e Del-Claro (2011) evidenciaram que o néctar proveniente de NEFs aumenta a sobrevivência, o tamanho corporal dos indivíduos e a quantidade de ovos das colônias de *Cephalotes pusillus*, uma espécie de formiga abundante em plantas do Cerrado (Lange e Del-Claro 2014). Além disso, fontes de recursos constantes e bastante nutritivas e energéticas, como o néctar de NEFs, são importantes para os comportamentos de territorialidade (Jackson, 1984) e amplamente utilizadas por formigas arborícolas (Blüthgen et al., 2004).

A alta abundância de formigas em plantas danificadas, principalmente nas que sofreram danos florais, pode ser explicada pela defesa induzida de plantas. Plantas que apresentam NEFs, após sofrerem injúrias, podem aumentar a produtividade dos NEFs (Heil et al., 2000; Radhika et al., 2008) e/ou liberar COVs (Bruinsma e Dicke, 2008; Radhika et al., 2008, Arimura et al., 2011). Neste estudo, foi visto que o aumento na quantidade e qualidade do néctar conduz para um aumento na abundância de formigas, principalmente quando as formigas que estão na planta são altamente representativas e dominantes, como as do gênero *Camponotus*.

Portanto, a fonte de recurso alimentar mais disponível e energética, o próprio comportamento territorial e dominante das espécies de formigas em flores e folhas são fatores que influenciaram para que existisse variação na abundância de formigas presentes nos grupos que sofreram danos.

4.2.2 Referências Bibliográficas

- Agrawal, A. A., 1998. Induced responses to herbivory and increased plant performance. **Science**, 279: 1201-1202.
- Agrawal, A. A., Rutter, M., 1998. Dynamic anti-herbivore defense in ant-plants: The role of induced responses. **Oikos**, 83: 227-236.
- Agrawal, A. A., Salminen, J-P., Fishbein, M., 2009. Phylogenetic trends in phenolic metabolism of milkweeds (*Asclepias*): Evidence for escalation. **Evolution**, 63: 663-673.
- Albrecht, M., Gotelli, N. J., 2001. Spatial and temporal niche partitioning in grassland ants. **Oecologia**, 126: 134-141.
- Appolinario, V., Schiavini, I., 2002. Levantamento fitossociológico de espécies arbóreas de Cerrado (*stricto sensu*) em Uberlândia, Minas Gerais. **Boletim do Herbário Ezechias Paulo Heringer**, 10: 57-75.
- Aranda-Rickert, A., Diez, P., Marazzi, B., 2014. Extrafloral nectar fuels ant life in deserts. **AoB PLANTS**, 6: plu068.
- Arimura, G., Kost, G., Boland, W., 2005. Herbivore-induced, indirect plant defences. **Biochimica et Biophysica Acta**, 734(2): 91-111.
- Arimura, G., Ozawa, R., Maffei, M. E., 2011. Recent advances in plant early signaling in response to herbivory. **Int. J. Mol. Sci.**, 12(6): 3723-3739.
- Assunção, M. A., Torezan-Silingardi, H. M., Del-Claro, K., 2014. Do ant visitors to extrafloral nectaries of plants repel pollinators and cause an indirect cost of mutualism? **Flora**, 209: 244-249.
- Baldwin, I. T., 1991. Damage-induced alkaloids in wild tobacco. In: Tallamy, D. W., Raupp, M. J. (Eds.). **Phytochemical Induction by Herbivores**. John Wiley & Sons, New York, 47-69.
- Baldwin, I. T., Preston, C. A., 1999. The eco-physiological complexity of plant responses to insect herbivores. **Planta**, 208: 137-145.
- Baldwin, I. T., Schultz, J. C., 1983. Rapid changes in tree leaf chemistry induced by damage: evidence for communication between plants. **Science**, 221: 277-279.
- Basset, Y., 1994. Palatability of tree foliage to chewing insects: a comparison between a temperate and tropical site. **Acta Oecologica**, 15:181-191.
- Battirola, L. D., Marques, M. I., Adis, J., Delabie, J. H. C., 2005. Composição da comunidade de Formicidae (Insecta, Hymenoptera) em copas de *Attalea phalerata* Mart. (Arecaceae), no Pantanal de Poconé, Mato Grosso, Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**, 49(1): 107-117.
- Benz, G., 1974. Negative feedback by competition for food and space, and by cyclic induced changes in the nutritional base as regulatory principles in the population dynamics of the larch budmoth, *Zeiraphera diniana* (Guenne) (Lep., Tortricidae). **Zeitschrift für Angewandte Entomologie**, 76: 196-228.
- Bixenmann, R. J., Coley, P. D., Kursar, T. A., 2011. Is extrafloral nectar production induced by herbivores or ants in a tropical facultative ant-plant mutualism? **Oecologia**, 165(2): 417-425.

- Blüthgen, N., Gottsberger, G., Fiedler, K., 2004. Sugar and amino acid composition of ant-attended nectar and honeydew sources from an Australian rainforest. **Austral Ecology**, 29: 418-429.
- Bolten, A. B., Feinsinger, P., Baker, H. G., Baker, I., 1979. On the calculation of sugar concentration in flower nectar. **Oecologia**, 41: 301-304.
- Bronstein, J. L., 1998. The contribution of ant-plant protection studies to our understanding of mutualism. **Biotropica** 30: 150-161.
- Bronstein, J. L., Alarcón, R., Geber, M., 2006. The evolution of plant-insect mutualisms. **New Phytologist**, 172: 412-428.
- Bruinsma, M., Dicke, M., 2008. Herbivore-induced indirect defence: from induction mechanisms to community ecology. In: Schaller, A. (Ed.). **Induced plant resistance to herbivory**. Berlin, Springer Verlag, 31–60.
- Bryant, J. P., Chapin, F. S. III., Klein, D. R., 1983. Carbon/nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory. **Oikos**, 40: 357-368.
- Byk, J., Del-Claro, K., 2010. Nectar- and pollen-gathering *Cephalotes* ants provide no protection against herbivory: a new manipulative experiment to test ant protective capabilities. **Acta Ethologica**, 13: 33-38.
- Byk, J., Del-Claro, K., 2011. Ant-plant interaction in the Neotropical Savanna: direct beneficial effects of extrafloral nectar on ant colony fitness. **Population Ecology**, 53: 327-332.
- Calixto, E. S., Lange, D., Del-Claro, K., 2015. Foliar anti-herbivore defenses in *Qualea multiflora* Mart. (Vochysiaceae): changing strategy according to leaf development. **Flora**, 212: 19-23.
- Carrillo, J., Wang, Y., Ding, J., Siemann, E., 2012. Induction of extrafloral nectar depends on herbivore type in invasive and native Chinese tallow seedlings. **Basic and Applied Ecology**, 13: 449-457.
- Cerdá, X., Retana, J., Manzaneda, A., 1998. The role of competition by dominants and temperature in the foraging of subordinate species in Mediterranean ant communities. **Oecologia**, 117: 404-412.
- Cipollini, M. L., Levey, D. J., 1997. Secondary metabolites of Xeshy vertebrate-dispersed fruits: adaptive hypotheses and implications for seed dispersal. **Am. Nat.**, 150: 346-372.
- Chantarasawat, N., Sitthicharoenchai, D., Chaisuekul, C., Lekprayoon, C., 2013. Comparison of ants (Hymenoptera: Formicidae) diversity in dry dipterocarp and mixed-deciduous forests at Sri Nan National Park, Northern Thailand. **Tropical Natural History**, 13(1): 1-19.
- Coley, P. D., Aide, T. M., 1991. Comparison of herbivory and plant defenses in temperate and tropical broad-leaved forests. In: Price, P. W., Lewinsohn, T. M., Fernandes, G. W., Benson, W. W. (Eds.). **Plant-Animal Interactions: Evolutionary Ecology in Tropical and Temperate Regions**. John Wiley & Sons, New York, p. 25–49.
- Coley, P. D., Bryant, J. P., Chapin, F. S. III., 1985. Resource availability and plant anti-herbivore defense. **Science**, 230: 895-899.
- Cousens, R., Dytham, C., Law, R., 2008. **Dispersal in Plants: A Population Perspective**. Oxford: Oxford University Press, 288 pp.

- Dafni, A., Kevan, P. G., Husband, B. C., 2005. **Practical pollination biology**. Ontario, Canada. 590 pp.
- Del-Claro, K., Guillermo-Ferreira, R., Almeida, E. M., Zardini, H., Torezan-Silingardi, H. M., 2013. Ants visiting the post-floral secretions of pericarpial nectaries in *Palicourea rigida* (Rubiaceae) provide protection against leaf herbivores but not against seed parasites. **Sociobiology**, 60: 217-221.
- Del-Claro, K., 2004. Multitrophic relationships, conditional mutualisms and the study of interaction biodiversity in tropical savannas. **Neotropical Entomology**, 33(6): 665-672.
- Del-Claro, K., Berto, V., Réu, W., 1996. Effect of herbivore deterrence by ants on the fruit set of an extrafloral nectary plant, *Qualea multiflora* (Vochysiaceae). **Journal of Tropical Ecology**, Aberdeen, 12: 887-892.
- Del-Claro, K., Oliveira, P. S., 1999. Ant-homoptera interactions in a Neotropical savanna: the honeydew-producing treehopper *Guayaquila xiphias* (Membracidae) and its associated ant fauna on *Didymopanax vinosum* (Araliaceae). **Biotropica**, 31(1): 135-144.
- Del-Claro, K., Torezan-Silingardi, H. M., 2009. Insect-Plant Interactions: New pathways to a better comprehension of ecological communities in neotropical savannas. **Neotrop. Entomol.**, 38: 159-164.
- Del-Claro, K., 2012. Origens e importância das relações plantas-animaís para a ecologia e conservação. In: Del-Claro, K.; Torezan-Silingardi, H. M. (Eds.). **Ecologia de interações plantas-animaís: uma abordagem ecológico-evolutiva**. Rio de Janeiro, Technical Books, p. 37-50.
- Díaz-Castelazo, C., Rico-Gray, V., Ortega, F., Ángeles, G., 2005. Morphological and secretory characterization of extrafloral nectaries in plants of Coastal Veracruz, Mexico. **Annals of Botany**, 96(7): 1175-1189.
- Ehrlich, P. R., Raven, P. H., 1964. Butterflies and plants: A study in coevolution. **Evolution**, 18: 586-608.
- Falcão, J. C. F., Dáttilo, W., Izzo, T. J., 2014. Temporal variation in extrafloral nectar secretion in different ontogenic stages of the fruits of *Alibertia verrucosa* S. Moore (Rubiaceae) in a Neotropical savanna. **Journal of Plant Interactions**, 1-6.
- Feeny, P., 1976. Plant apparency and chemical defense. **Recent Adv. Phytochem.**, 10: 1-40.
- Flinn, P. W., Hower, A. A., Knievel, D. P., 1990. Physiological response of alfalfa to injury by *Empoasca fabae* (Homoptera: Cicadellidae). **Environ. Entomol.**, 19:176-181.
- González-Teuber, M., Heil, M., 2009. Nectar chemistry is tailored for both attraction of mutualists and protection from exploiters. **Plant Signaling & Behavior**, 4: 809-813.
- González-Teuber, M., Silva-Bueno, J. C., Heil, M., Boland, W., 2012. Increased host investment in extrafloral nectar (EFN) improves the efficiency of a mutualistic defensive service. **PLoS ONE**, 7(10), e46598.
- Gómez, S., Ferrieri, R. A., Schueller, M., Orians, C. M., 2010. Methyl jasmonate elicits rapid changes in carbon and nitrogen dynamics in tomato. **New Phytologist**, 188: 835-844.
- Green, T. R., Ryan, C. A., 1972. Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: a possible defense mechanism against insects. **Science**, 175: 776-777.

- Hanna, C., Naughton, I., Boser, C., Alarcón, R., Hung, K. J., Holway, D., 2015. Floral visitation by the Argentine ant reduces bee visitation and plant seed set. **Ecology**, 96: 222-230.
- Haukioja, E., Hakala, T., 1975. Herbivore cycles and periodic outbreaks. Formulation of a general hypothesis. **Report of the Kevo Subarctic Research Station**, 12: 1-9.
- Heil, M., 2009. Damaged-self recognition in plant herbivore defence. **Trends in Plant Science**, 14: 356-363.
- Heil, M., Fiala, B., Baumann, B., Linsenmair, K. E., 2000. Temporal, spatial and biotic variations in extrafloral nectar secretion by *Macaranga tanarius*. **Functional Ecology**, 14: 749-757.
- Heil, M., Silva-Bueno, J. C., 2007. Within-plant signaling by volatiles leads to induction and priming of an indirect plant defense in nature. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 104: 5467-5472.
- Holland, J. N., Chamberlain, S. A., Horn, K. C., 2010. Temporal variation in extrafloral nectar secretion by reproductive tissues of the senita cactus, *Pachycereus schottii* (Cactaceae), in the Sonoran Desert of Mexico. **Journal of Arid Environments**, 74: 712-714.
- Holland, J. N., Chamberlain, S. C., Horn, K., 2009. Optimal defence theory predicts investment in extrafloral nectar resources in an ant-plant mutualism. **Journal of Ecology**, 97: 89-96.
- Hölldobler, B., Wilson, E. O., 1990. **The ants**. Harvard University Press, Cambridge, MA. 732 pp.
- Jaber, L. R., Vidal, S., 2010. Fungal endophyte negative effects on herbivory are enhanced on intact plants and maintained in a subsequent generation. **Ecological Entomology**, 35: 25-36.
- Jackson, D. A., 1984. Ant distribution patterns in a *Cameroonian cocoa* plantation: investigation of the ant mosaic hypothesis. **Oecologia** 62: 318-324.
- Jones, I. M., Koptur, S., 2015. Dynamic extrafloral nectar production: The timing of leaf damage affects the defensive response in *Senna mexicana* var. *chapmanii* (Fabaceae). **Am J Bot.**, 102(1): 58-66.
- Karban, R., 1993. Costs and benefits of induced resistance and plant density for a native shrub, *Gossypium thurberi*. **Ecology**, 74: 9-19.
- Karban, R., 2011. The ecology and evolution of induced resistance against herbivores. **Funct. Ecol.**, 25: 339-347.
- Karban, R., Baldwin, I. T., 1997. **Induced Responses to Herbivory**. Chicago University Press, Chicago. 317 pp.
- Karban, R., Carey, J. R., 1984. Induced resistance of cotton seedlings to mites. **Science**, 225: 53-54
- Karban, R., Myers, J. H., 1989. Induced plant responses to herbivory. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 20: 331-348.
- Kessler, A., 2015. The information landscape of plant constitutive and induced secondary metabolite production. **Current Opinion in Insect Science**, 8: 1-7.

- Koptur, S., 1992. Extrafloral nectary-mediated interactions between insects and plants. In: Bernays, E. (Ed.). **Insect-Plant Interactions**. Boca raton, CRC Press, 81-129.
- Koptur, S., 2005. Nectar as fuel for plant protectors. In: Wäckers F. L., Rijn, P. C. J., Bruin, J. (Eds.). **Plant-provided food for carnivorous insects: a protective mutualism and its applications**. Cambridge University Press, New York, 75–108.
- Korndörfer, A. P., Del-Claro, K., 2006. Ant defense versus induced defense in *Lafoensia pacari* (Lythraceae), a myrmecophilous tree of the Brazilian Cerrado. **Biotropica**, 38: 786-788.
- Kursar, T. A., Coley, P. D., 2003. Convergence in defense syndromes of young leaves in tropical rainforests. **Biochem. Syst. Ecol.**, 31, 929-949.
- Kwok, K. E., Laird, R. A., 2012. Plant age and the inducibility of extrafloral nectaries in *Vicia faba*. **Plant Ecology**, 213: 1823-1832.
- Lange, D., Dáttilo, W., Del-Claro, K., 2013. Influence of extrafloral nectary phenology on ant–plant mutualistic networks in a neotropical savanna. **Ecol. Entomol.**, 38: 463-469.
- Lange, D., Del-Claro, K., 2014. Ant-plant interaction in a tropical savanna: May the network structure vary over time and influence on the outcomes of associations? **PLoS ONE**, 9, e105574.
- Leiss, K. A., Klinkhamer, P. G. L., 2005. Genotype by environment interactions in the nectar production of *Echium vulgare*. **Functional Ecology**, 19: 454-459.
- Levin, D. A., York, B. M., 1978. Toxicity of plant alkaloids: an ecogeographic perspective. **Biochem. Syst. Ecol.**, 6: 61–76
- Lowman, M. D., 1985. Temporal and spatial variability in insect grazing of the canopies of five Australian rain-forest tree species. **Austr. J. Ecol.**, 10: 7-24.
- Machado, S. R., Morellato, L. P. C., Sajo, M. G., Oliveira, P. S., 2008. Morphological patterns of extrafloral nectaries in woody plant species of the Brazilian Cerrado. **Plant Biology**, 10: 660-673.
- Marazzi, B., Bronstein, J. L., Koptur, S., 2013. The diversity: ecology and evolution of extrafloral nectaries: current perspectives and future challenges. **Ann. Bot.** 111: 1243-1250.
- Marquis, R. J., Braker, H. E., 1994. Plant-herbivore interactions: diversity, specificity, and Impact. In: McDade, L. A., Bawa, K. S., Hespeneide, H. A., Hartshorn G. S. (Eds.). **La Selva: Ecology and Natural History of a Neotropical Rain Forest**. Chicago University Press, Chicago 261-281.
- Marquis, R. J., Ricklefs, R. E., Abdala-Roberts, L., 2012. Testing the low latitude/high defense hypothesis for broad-leaved tree species. **Oecologia**, 169: 811-820.
- McCall, A. C., Fordyce, J. A., 2010. Can optimal defence theory be used to predict the distribution of plant chemical defences? **Journal of Ecology**. 98: 985-992.
- McKey, D., 1974. Adaptive patterns in alkaloid physiology. **American Naturalist**, 108: 305-320.
- McKey, D., 1979. The distribution of plant secondary compounds within plants. In: Rosenthal, G. A., Janzen, D. H. (Eds.). **Herbivores: their interactions with secondary plant metabolites**, Academic press, New York, 55–133.

- Mitchell, R. J., 2004. Heritability of nectar traits: why do we know so little? **Ecology**, 85:1527-1533.
- Mondor, E. B., Tremblay, M. N., Messing, R. H., 2006. Extrafloral nectary phenotypic plasticity is damage- and resource-dependent in *Vicia faba*. **Biology Letters**, 2: 583-585.
- Morris, W. F., Traw, M. B., Bergelson, J., 2006. On testing for a tradeoff between constitutive and induced resistance. **Oikos**, 112: 102–110.
- Mortensen, B., 2013. Plant resistance against herbivory. **Nat. Educat. Knowl.**, 4(4): 5.
- Nahas, L., Gonzaga, M. O., Del-Claro, K., 2012. Intraguild interactions between ants and spiders reduce herbivory: an extrafloral nectaried tree of tropical savanna. **Biotropica**, 44: 498-505.
- Nascimento, E. A., Del-Claro, K., 2010. Ant visitation to extrafloral nectaries decreases herbivory and increases fruit set in *Chamaecrista debilis* (Fabaceae) in a Neotropical savanna. **FLORA**, 205: 754-756.
- Negrelle, R. R. B., 2011. Qualea Aubl. from Paraná State, Brazil. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, 33: 347-355.
- Ness, J. H., 2003. *Catalpa bignonioides* alters extrafloral nectar production after herbivory and attracts ant bodyguards. **Oecologia**, 134:210-218.
- Nicolson, S. W., Nepi, M., 2005. Dilute nectar in dry atmosphere: nectar secretion patterns in *Aloe castanea* (Asphodelaceae). **International Journal of Plant Sciences**, 166: 227-233.
- Nicolson, S. W., Nepi, M., Pacini, E., 2007. **Nectaries and nectar**. Springer, Dordrecht, The Netherlands. 414 pp.
- Nitao, J. K., Zangerl, A. R., 1987. Floral development and chemical defense allocation in wild parsnip (*Pastinaca sativa*). **Ecology** 68: 521-529.
- Nogueira, A., Guimaraes, E., Machado, S. R., Lohmann, L. G., 2012. Do extrafloral nectaries present a defensive role against herbivores in two species of the family Bignoniaceae in a Neotropical savanna? **Plant Ecology**, 213: 289-301.
- O'Dowd, D. J., Catchpole, E. A., 1983. Ants and extrafloral nectaries: no evidence for plant protection in *Helichrysum* spp. ant interactions. **Oecologia**, 59: 191-200.
- Obeso, J. R., 1997. The induction of spinescence in European holly leaves by browsing ungulates. **Plant Ecology**, 129: 149-156.
- Ohgushi, T., 2008. Herbivore-induced indirect interaction webs on terrestrial plants: the importance of non-trophic, indirect, and facilitative interactions. **Entomologia experimentalis et applicata**, 128: 217-229.
- Oliveira, P. S., Freitas, A. V. L., 2004. Ant-plant-herbivore interactions in the neotropical Cerrado savanna. **Naturwissenschaften**, 91: 557-570.
- Oliveira, P. S., Leitão-Filho, H. F., 1987. Extrafloral Nectaries: Their taxonomic distribution and abundance in the woody flora of Cerrado vegetation in Southeast Brazil. **Biotropica**, 19: 140-148.
- Oliveira, P. S., Marquis, R. J., 2002. **The Cerrados of Brazil: Ecology and natural history of neotropical savanna**. Columbia University Press, New York, 398 pp.

- Oliveira-filho, A. T., Ratter, J. A., 2002. Vegetation physiognomies and woody flora of the Cerrado Biome. In: Oliveira, P. S., Marquis, R. J. (Eds.). **The Cerrados of Brazil: ecology and natural history of a Neotropical savanna**. Columbia University Press, New York, 91-120.
- Paschold, A., Halitschke, R., Baldwin, I. T., 2007. Co(i)-ordinating defenses: NaCOI1 mediates herbivore-induced resistance in *Nicotiana attenuate* and reveals the role of herbivore movement in avoiding defenses. **Plant J.**, 51: 79-91.
- Petanidou, T., 2007. Floral nectars in Mediterranean habitats. In: Nicolson, S. W., Nepi, M., Pacini, E. (Eds.). **Nectaries and nectar**. Springer, Dordrecht, 167-214.
- Pulice, C. E., Packer, A. A., 2008. Simulated herbivory induces extrafloral nectar production in *Prunus avium*. **Functional Ecology**, 22: 801-807.
- Quental, T. B., Trigo, J. R., Oliveira, P. S., 2005. Host-plant flowering status and the concentration of sugar in phloem sap: effects on an ant-treehopper interactions. **Eur. J. Entomol.**, 102::201-205.
- Radhika, V., Kost, C., Bartram, S., Heil, M., Boland, W., 2008. Testing the optimal defence hypothesis for two indirect defences: Extrafloral nectar and volatile organic compounds. **Planta**, 228: 449-457.
- Ratter, J. A., Ribeiro, J. F., Bridgewater, S., 1997. The brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. **Annals of Botany**, 80: 223-230.
- Rhoades, D. F., Cates, R. G. 1976., Toward a general theory of plant antiherbivore chemistry. **Recent Adv. Phytochem.**, 10: 168-213.
- Rico-Gray, V., 1993. Use of plant-derived food resources by ants in the dry tropical lowlands of coastal Veracruz, Mexico. **Biotropica**, 25: 301-315.
- Rico-Gray, V., 1989. The importance of floral and circum-floral nectar to ants inhabiting dry tropical lowlands. **Biological Journal of the Linnean Society**, 38: 173-181.
- Rico-Gray, V., Oliveira, P. S., 2007. **The ecology and evolution of ant-plant interactions**. The University of Chicago Press, Chicago. 331 pp.
- Rosumek, F. B., Silveira, F. A. O., Neves, F. S., Barbosa, N. P., Diniz, L., OKI, Y., Pezzini, F., Fernandes, G. W., Cornelissen. T., 2009. Ants on plants: a meta-analysis of the role of ants as plant biotic defenses. **Oecologia**, 160: 537-549.
- Rudgers, J. A., 2004. Enemies of herbivores can shape plant traits: selection in a facultative ant-plant mutualism. **Ecology**, 85: 192-205.
- Rudgers, J. A., Gardener, M. C., 2004. Extrafloral nectar as a resource mediating multispecies interactions. **Ecology**, 85: 1495-1502.
- Schneider, M., Schweizer, P., Meuwly, P., Metraux, J. P. 1996. Systemic acquired resistance in plants. In: Jeon, K. W. (Ed.). **International Review of Cytology**. Academic Press, San Diego, California, USA, 303-340.
- Seldal, T., Andersen, K. J., Högstedt, G., 1994. Grazing-induced proteinase inhibitors: A possible cause for lemming population cycles. **Oikos**, 70:3-11.
- Sendoya, S. F., Freitas, A. V. L., Oliveira, P. S., 2009. Egg-laying butterflies distinguish predaceous ants by sight. **American Naturalist**, 174: 134-140.

- Stamp, N. E., 1992. Theory of plant-insect herbivore interactions on the inevitable brink of re-synthesis. **Bulletin of the Ecological Society of America**, 73: 28-34.
- Stout, M. J., Duffey, S. S., 1996. Characterization of induced resistance in tomato plants. **Entomol. Exp. Appl.**, 79: 273-283.
- Taiz, L., Zeiger, E., 2009. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre, Artmed. 819 pp.
- Tavares, A. A., Bispo, C. P., Zanzini, A. C., 2008. Effect of collect time on communities of epigaeic ants (Hymenoptera: Formicidae) in areas of *Eucalyptus cloeziana* and cerrado. **Neotropical Entomology**, 37(2): 126-130.
- Thaler, J. S., Stout, M. J., Karban, R., Duffey, S. S., 2001. Jasmonate-mediated induced plant resistance affects a community of herbivores. **Ecological Entomology**, 26: 312-324.
- Thompson, J. N., 2005. **The geographic mosaic of coevolution**. University of Chicago Press, Chicago. 443 pp.
- Thompson, J. N., 2013. **Relentless Evolution**. University of Chicago Press, Chicago. 499 pp.
- Underwood, N. Rausher, M. D., 2002. The effects of host-plant genotype on herbivore population dynamics in a model system. **Ecology**, 81:1565-1576.
- Varanda, E. M., Barosela, J. R., Oki, Y., Pais, M. P., Cerri, A., 2005. Defesas vegetais contra insetos folívoros. In: Pivello, V. R., Varanda, E. M. (Eds.). **O cerrado Pé-de-Gigante: ecologia e conservação**. São Paulo, SMA. 256 pp.
- WÄCKERS, F. L., BONIFAY, C., 2004. How to be sweet? Extrafloral nectar allocation by *Gossypium hirsutum* fits optimal defense theory predictions. **Ecology**, 85: 1512-1518.
- Womack, C. L., 1984. Reduction in photosynthetic and transpiration rates of alfalfa caused by the potato leafhopper (Homoptera: Cicadellidae) infestations. **J. Econ. Entomol.**, 77: 508-513.
- Young, T. P., Stanton, M. L., Christian, C., 2003. Effects of natural and simulated herbivory on spine lengths of *Acacia drepanolobium* in Kenya. **Oikos** 101: 171-179.
- Young, T. P., Okello, B. D., 1998. Relaxation of an induced defense after exclusion of herbivores: spines on *Acacia drepanolobium*. **Oecologia**, 115: 508-513.
- Zangerl, A. R., 2003. Evolution of induced responses to herbivores. **Basic & Applied Ecology**, 4: 91-103.
- Zangerl, A. R., Bazzaz, F. A., 1992. Theory and pattern in plant defense allocation. In: Fritz, R. S., Simms, E. L. (Eds.). **Plant resistance to herbivores and pathogens: ecology, evolution, and genetics**. Univ. of Chicago Press, Chicago, IL, 363-391.
- Zangerl, A. R., Rutledge, C. E., 1996. The probability of attack and patterns of constitutive and induced defense: A test of optimal defense theory. **American Naturalist**, 147: 599-608.
- Zar, J. H., 2010. **Biostatistical Analysis**. Pearson Prentice-Hall, Upper Saddle River, NJ. 944 pp.
- Zavala, J. A., Scopel, A. L., Ballaré, C. L., 2001. Effects of ambient UV-B radiation on soybean crops: impact on leaf herbivory by *Anticarsia gemmatilis*. **Plant Ecol.**, 156(2): 121-130.

2 CONCLUSÃO GERAL

Os resultados apresentados nos dois capítulos dessa dissertação demonstram que *Q. multiflora* apresenta um sistema complexo de defesa contra herbivoria. Ao mesmo tempo em que é capaz de sincronizar defesas ao longo do desenvolvimento foliar para manter seu nível de proteção alto e constante, é capaz de responder aos danos imprevistos e maximizar defesas, como observado para a produtividade dos NEFs. Além disso, essas plantas são capazes de responder a danos em estruturas vegetativas e reprodutivas de forma diferente. Por fim, formigas apresentaram uma estreita relação com essas plantas, modificando características de forrageamento em resposta a estímulos produzidos pelas mesmas, no qual um grupo interfere e responde ao outro de forma coerente e precisa. Portanto, por meio desses resultados, pode-se afirmar que o presente estudo traz grandes contribuições para o entendimento das interações tri-tróficas e dos diversos fatores que moldam, alteram e estruturam as comunidades e o ecossistema.