

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA

**Efeitos da intensidade de danos foliares no mutualismo de proteção entre  
formigas e *Banisteriopsis malifolia* (Nees e Mart.) B. Gates (Malpighiaceae)**

Isabela Cristina de Oliveira Pimenta

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da  
Universidade de São Paulo, como parte das  
exigências para obtenção do título de Mestra em  
Ciências, obtido no Programa de Pós-Graduação  
em Entomologia

Ribeirão Preto, SP

2022

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA

**Efeitos da intensidade de danos foliares no mutualismo de proteção entre  
formigas e *Banisteriopsis malifolia* (Nees e Mart.) B. Gates (Malpighiaceae)**

Isabela Cristina de Oliveira Pimenta

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para obtenção do título de Mestra em Ciências, obtido no Programa de Pós-Graduação em Entomologia.

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

Ribeirão Preto - SP

2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

De Oliveira Pimenta, Isabela Cristina

Efeitos da intensidade de danos foliares no mutualismo de proteção entre formigas e *Banisteriopsis malifolia* (Malpighiaceae). Ribeirão Preto, 2022.

42 p. : il. ; 30 cm

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

Orientador: Dr. Kleber Del Claro.

1. Simulação de herbivoria. 2. Interação inseto-planta. 3. Nectários extraflorais. 4. Sucesso reprodutivo. 5. Formigas.

Aos meus pais, Rosimeire e Reginaldo,  
que sempre me apoiaram e estiveram ao meu lado.

**Dedico.**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por ter guiado meus passos e por ter me sustentado até aqui. Agradeço aos meus pais, Rosimeire e Reginaldo, e meu irmão Caio, por sempre estarem ao meu lado em todas as etapas de minha vida.

Agradeço ao meu orientador Dr. Kleber Del Claro, ao Dr. Eduardo Calixto Soares e à Profa. Dra. Helena Maura Torezan-Silingardi, pela paciência e pelos ensinamentos em todo meu mestrado.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro, através do processo 88887.512026/2020-00.

Agradeço ao Clube Caça e Pesca Itororó de Uberlândia (CCPIU) pelo local de coleta, à Universidade Federal de Uberlândia (UFU) pela infraestrutura, à Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP - USP) por todo suporte técnico e a todos que de alguma forma, contribuíram para a realização desse trabalho.

*Lembre-se da minha ordem: “Seja forte e corajoso! Não fique desanimado,  
nem tenha medo, porque eu, o Senhor, seu Deus, estarei com você  
em qualquer lugar para onde você for!”*

*Josué 1:9*

## SUMÁRIO

RESUMO .....	8
ABSTRACT .....	9
1. INTRODUÇÃO .....	11
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	14
2.1 Área de estudo e espécie avaliada .....	14
2.2 Design experimental .....	15
2.3 Nectários extraflorais e formigas .....	17
2.4 Traços florais .....	17
2.5 Sucesso reprodutivo .....	18
2.6 Análise dos dados .....	19
2.6.1 Nectários extraflorais e formigas .....	19
2.6.2 Traços florais .....	20
2.6.3 Sucesso reprodutivo .....	20
3. RESULTADOS .....	21
3.1 Nectários extraflorais e Formigas .....	21
3.2 Traços florais .....	25
3.3 Sucesso reprodutivo .....	31
4. DISCUSSÃO .....	33
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	36

## RESUMO

De Oliveira Pimenta, I. C. **Efeitos da intensidade de danos foliares no mutualismo de proteção entre formigas e *Banisteriopsis malifolia* (Nees e Mart.) B. Gates (Malpighiaceae)**. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022, 42 páginas.

Interações planta-herbívoro surgiram há aproximadamente 400 milhões de anos, essa relação pode impactar negativamente o sucesso reprodutivo das plantas. Os danos causados pelos herbívoros às plantas podem causar alterações em suas características florais, afetando indiretamente o comportamento de visitantes florais e reduzindo a frutificação das plantas. Além de poder prejudicar seu crescimento e reprodução, através da realocação de recursos. Diante disso, as plantas desenvolveram diversos mecanismos para se defender dos danos causados pelos herbívoros, um desses mecanismos é a defesa biótica fornecida por formigas. A defesa biótica consiste no mutualismo facultativo ou obrigatório que algumas plantas possuem com outros organismos, no caso das formigas, oferecem recursos e/ou abrigo em troca de proteção contra herbivoria, como é o caso de *Banisteriopsis malifolia* (Malpighiaceae). Esta planta estabelece uma relação mutualística com formigas, oferecendo néctar extrafloral em troca de proteção contra os ataques de herbívoros. Sendo assim, este estudo teve por objetivo verificar se a herbivoria foliar, em diferentes intensidades em *B. malifolia*, influencia seu sucesso reprodutivo e os padrões de secreção de néctar extrafloral; consequentemente alterando o forrageamento e atividade das formigas associadas. Os resultados mostram que *B. malifolia* responde a diferentes intensidades de dano foliar. Plantas com níveis intermediários de danos conseguem compensar os danos causados, produzindo inflorescências maiores e néctar extrafloral com maior concentração de açúcar, enquanto plantas com altos níveis de danos são as mais prejudicadas, demorando mais tempo para produzir inflorescências e flores, produzindo poucas inflorescências e, inflorescências, botões, flores e frutos menores. Além disso, o



aumento na concentração de açúcar do néctar dos nectários extraflorais (NEFs) influenciou o padrão de forrageamento das formigas, mostrando que a cada uma unidade de aumento na concentração de açúcar do néctar, há um aumento de 1.03 de formigas na planta. Concluindo, este estudo mostra que a planta *B. malifolia*, responde a diferentes níveis de danos foliares e que isso afeta seus traços florais e sucesso reprodutivo.

**Palavras-chave:** simulação de herbivoria – interação inseto-planta – nectários extraflorais – sucesso reprodutivo – formigas.

### ABSTRACT

De Oliveira Pimenta, I. C. **Effects of leaf damage intensity on protective mutualism between ants and *Banisteriopsis malifolia* (Nees e Mart.) B. Gates (Malpighiaceae).** Dissertation (Master in Entomology) – Faculty of Philosophy, Sciences and Letters at Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2022, 42 pages.

Plant-herbivore interactions emerged approximately 400 million years ago; this relationship can negatively impact the reproductive success of plants. Herbivore damage to plants can cause changes in the floral characteristics of the plant, indirectly affecting the behavior of floral visitors and reducing plant fruiting. In addition to being able to impair their growth and reproduction, through the reallocation of resources. Considering this, the plants has developed several mechanisms to defend itself from the damage caused by herbivores, one of these mechanisms is the biotic defense provided by ants. The biotic defense consists of the facultative or obligatory mutualism that some plants have with other organisms, in the case of ants, they offer resources and/or shelter in exchange for protection against herbivory, as is the case of *Banisteriopsis malifolia* (Malpighiaceae). This plant establishes a mutualistic relationship with ants, offering extrafloral nectar in exchange for protection against herbivore attacks. Thus, this study aimed to verify whether leaf herbivory at different intensities in *B. malifolia* influences

its reproductive success and the patterns of extrafloral nectar secretion; consequently, altering the foraging and activity of the associated ants. The results show that *B. malifolia* responds to different intensities of leaf damage. Plants with intermediate levels of damage manage to compensate for the damage caused, while plants with high levels of damage suffer the most, taking longer to produce inflorescences and flowers, producing few inflorescences and, smaller inflorescences, buds, flowers, and fruits. In addition, the increased sugar concentration of nectar from extrafloral nectaries (EFNs) influences the foraging pattern of ants, showing that for every one unit increase in the nectar sugar concentration, there is an increase of 1.03 ants on the plant. In conclusion, this study shows that the plant *B. malifolia*, responds to different levels of leaf damage and that this affects its floral traits and reproductive success.

**Keywords:** herbivory simulation – insect-plant interactions – extrafloral nectaries – reproductive success – ants.

## 1 – INTRODUÇÃO

As interações entre plantas e animais, sejam eles invertebrados ou vertebrados, são antigas e amplamente distribuídas, podendo ser muito variáveis tanto nos tipos de organismos que se relacionam, como nos resultados gerados por essas interações (Thompson 1994, 2005, Del-Claro 2012, Del-Claro & Torezan-Silingardi 2021). Interações planta-herbívoro, especificamente, surgiram no início do Devoniano há cerca de 400 milhões de anos (Labandeira 2007). Essa relação antagônica é caracterizada pela alimentação de tecidos vegetais por insetos (Labandeira 1998, Schoonhoven *et al.* 2005), o que pode impactar negativamente o sucesso reprodutivo da planta. Alguns estudos têm mostrado que danos foliares infligidos por insetos podem levar a alterações das características florais da planta, finalmente levando a alterações nos padrões comportamentais dos visitantes florais e muitas vezes reduzindo a frutificação das plantas (Carper *et al.* 2016, mas veja Cozzolino *et al.* 2015). Esses impactos causados pelos insetos herbívoros podem ocorrer diretamente ou indiretamente. Por exemplo, a herbivoria pode causar uma diminuição da área fotossintética da planta, resultando em menor área foliar disponível para manter o processo de fotossíntese, prejudicando o crescimento e reprodução vegetal (Crawley 1983, Taiz & Zeiger 2009). Além disso, a herbivoria pode alterar a alocação de recursos das plantas, o que pode levar a um menor investimento em recursos para reprodução e mais para defesa (Karban 2011). Isso pode resultar em impactos diretos no desenvolvimento da planta, resultando em alterações no tamanho, forma e cor das partes reprodutivas; e impactos indiretos na polinização, uma vez que essas variações nas características florais podem ter consequências positivas, neutras ou negativas no comportamento dos polinizadores (Cozzolino *et al.* 2015, Lucas-Barbosa 2016, Jacobsen & Raguso 2018).

Para impedir ou diminuir os danos causados por insetos, ou mesmo por outras pressões ambientais, como fatores abióticos severos (e.g. chuvas, fogo e geadas), as plantas desenvolveram diferentes mecanismos, estratégias e características de resistência e tolerância,

tendo como consequência alterações em seu metabolismo primário e secundário, podendo afetar diretamente sua reprodução (Crawley 1983, Futuyma 1992, Lucas-Barbosa 2016, Jacobsen & Raguso 2018, Kessler & Chautá 2020). Esses mecanismos podem ser químicos, físicos, bióticos ou fenológicos (Crawley 1983, Del-Claro & Oliveira 1999, Del-Claro & Torezan-Silingardi 2012, Calixto *et al.* 2015, Marquis & Moura 2021). A defesa química de plantas pode ser representada por compostos secundários, como por exemplo alcaloides, terpenóides e compostos orgânicos voláteis (VOCs) (Cozzolino *et al.* 2015, POPA *et al.* 2020). A defesa física é caracterizada por adaptações morfológicas ou mecânicas, como espinhos e tricomas (Junker *et al.* 2011, Calixto *et al.* 2015, Tagawa 2018). As plantas também possuem defesas fenológicas e diversas formas de escape (Marquis & Moura 2021), como a expansão rápida das folhas (Coley & Barone 1996, Coley *et al.* 2005), incompatibilidade nos recursos utilizados por diferentes herbívoros e o pico de abundância desses herbívoros (Vilela *et al.* 2014), além de reduzir a produção de recursos em um ano e aumentar em outro, tornando imprevisível a disponibilidade de recursos ao herbívoro (Marquis & Moura 2021). Por fim, plantas podem ainda se associar a inimigos naturais de seus herbívoros, como formigas, vespas e aranhas, formando um mecanismo de proteção denominado defesa biótica (Del-Claro *et al.* 2016, Pearse *et al.* 2020, Moura *et al.* 2021). Muitas plantas, principalmente as angiospermas, apresentam estruturas para fornecer abrigo e/ou recursos alimentares como é o caso do néctar extrafloral produzido pelos nectários extraflorais (NEFs) (Koptur 1992, Calixto *et al.* 2018).

NEFs são glândulas produtoras de um líquido aquoso rico em carboidratos e outros compostos diluídos, como fenóis, alcaloides, aminoácidos e lipídios (Baker 1977, González-Teuber & Heil 2009). Por ser um líquido altamente energético e importante para o desenvolvimento das formigas (Byk & Del-Claro 2010, Calixto, Lange & Del-Claro 2021), essas parceiras mutualistas acabam fornecendo proteção contra o ataque de herbívoros, estabelecendo associações facultativas com essas plantas hospedeiras, e às vezes, até

obrigatórias (Oliveira & Freitas 2004, Del-Claro *et al.* 2016, Calixto *et al.* 2018). Alguns estudos têm mostrado que essa relação entre formigas e plantas portadoras de NEFs produz impactos diretos sobre a herbivoria foliar e indiretos no sucesso reprodutivo da planta (Rosumek *et al.* 2009, Trager *et al.* 2010, Del-Claro *et al.* 2016, Calixto *et al.* 2018). Desta forma, as formigas são consideradas os principais agentes bióticos de defesa das plantas contra a herbivoria, e o néctar extrafloral representa um recurso chave para as interações entre plantas e seus predadores (Rico-Gray & Oliveira 2007, Rosumek *et al.* 2009, Marquis 2012).

Os danos causados pelos herbívoros podem ainda induzir a produção de néctar extrafloral, consequentemente alterando os padrões de forrageamento das formigas (Anjos *et al.* 2017, Raupp *et al.* 2020, Calixto, Lange, Bronstein, *et al.* 2021). Por exemplo, estudando a resposta induzida dos NEFs de *Qualea parviflora* (Vochysiaceae), Raupp *et al.* (2020) verificaram que o tipo de dano foliar (mastigação ou perfuração) pode influenciar os resultados do mutualismo formiga-planta. Além disso, os níveis de indução dos NEFs e a resposta das formigas a esses danos são diretamente relativos ao nível e ao local de dano na planta (Calixto, Lange, Bronstein, *et al.* 2021). Entretanto, a herbivoria não afeta somente as defesas induzidas das plantas, ela pode desencadear diferentes respostas, seja elas direta (*e.g.* alteração das características florais da planta) ou indiretamente (*e.g.* alteração nos padrões de polinização), o que resulta não só em prejuízos para a planta (Moreira *et al.* 2019), mas também em benefícios (Korndörfer & Del-Claro 2006). Poucos estudos exploram como a intensidade de danos foliares podem alterar a produção dos NEFs, o comportamento das formigas e o sucesso reprodutivo da planta; dessa forma, é preciso avaliar quais são os efeitos das diferentes intensidades de danos foliares na produção dos NEFs, na atratividade das formigas e no sucesso reprodutivo da planta.

Diante disso, o objetivo do presente estudo foi verificar se a herbivoria foliar em diferentes intensidades em uma planta com NEFs, *Banisteriopsis malifolia* (Malpighiaceae), influencia os padrões de secreção de néctar extrafloral, consequentemente alterando o

forrageamento e atividade das formigas associadas e o sucesso reprodutivo da planta. A principal hipótese é que danos foliares podem influenciar a produção de NEFs, os padrões de forrageamento das formigas e o sucesso reprodutivo da planta, mas a magnitude desses efeitos está diretamente relacionada ao nível de dano. As predições são: (i) baixos níveis de dano foliar (<5% da área foliar total) não serão significativos a ponto de gerar variações nos fatores estudados (volume e concentração de açúcar nos NEFs, comportamento de formigas, componentes reprodutivos); (ii) níveis intermediários de danos (50% da área foliar total) causarão alterações positivas no comportamento de forrageamento das formigas (atraindo-as para as plantas) e nos componentes reprodutivos da planta em função de uma resposta induzida mais acentuada do que apenas 5%, devendo produzir maior volume e concentração de açúcar nos NEFs (Cozzolino *et al.* 2015, Rusman *et al.* 2019); e (iii) níveis altos de dano (50% da área foliar total) causarão um efeito positivo no comportamento de forrageamento das formigas e negativo na planta, uma vez que diminuirá significativamente a área fotossintética da planta, afetando a produção de recursos alocados para a reprodução, devendo produzir maior volume e concentração de açúcar nos NEFs do que nos danos menores (Taiz & Zeiger 2009).

## **2 - MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Área de estudo e espécie avaliada**

O estudo de campo foi realizado na Reserva Ecológica do Clube de Caça e Pesca Itororó de Uberlândia, no município de Uberlândia-MG (48°17'27,0" W; 18°58'30,6" S), Brasil, onde a principal fitofisionomia é o cerrado sentido restrito, composto por árvores de até 10m espaçadas e entremeadas por arbustos e grama. A área também é caracterizada pela presença de vereda, campo úmido, floresta mesofítica e floresta de galeria (Appolinario & Schiavini 2002, Del-Claro *et al.* 2019). O clima da região apresenta duas estações bem definidas, uma seca e fria de abril a setembro e outra úmida e quente de outubro a março (Alvares *et al.* 2013, Novaes

*et al.* 2020).

A espécie estudada foi *Banisteriopsis malifolia* (Nees & Mart.) B. Gates (Figura 1), um arbusto da família Malpighiaceae, comum em formações arbustivas do Cerrado. Possui ramos seríceos e folhas opostas. As folhas possuem um par de NEFs na base perto do pecíolo, um de cada lado da nervura central. Suas inflorescências podem ser terminais ou axilares, com brácteas persistentes, geralmente oblongas, e pedicelos sésseis. As flores contêm sépalas, suas pétalas são alvas ou rosadas, ficando amarelo pálidas quando senescentes. Os frutos são do tipo samarídeos de coloração esverdeada, são seríceos e glabrescentes em direção ao ápice. Sua floração e frutificação ocorre de fevereiro a outubro (Carvalho *et al.* 2010, Alves-Silva *et al.* 2013, Calixto, Lange, Bronstein, *et al.* 2021). Essa espécie é muito abundante na área de estudo e apresenta interações com formigas mediadas pelos NEFs, os quais estão ativos nas folhas jovens durante os meses de novembro e dezembro (Calixto, Lange, Bronstein, *et al.* 2021).



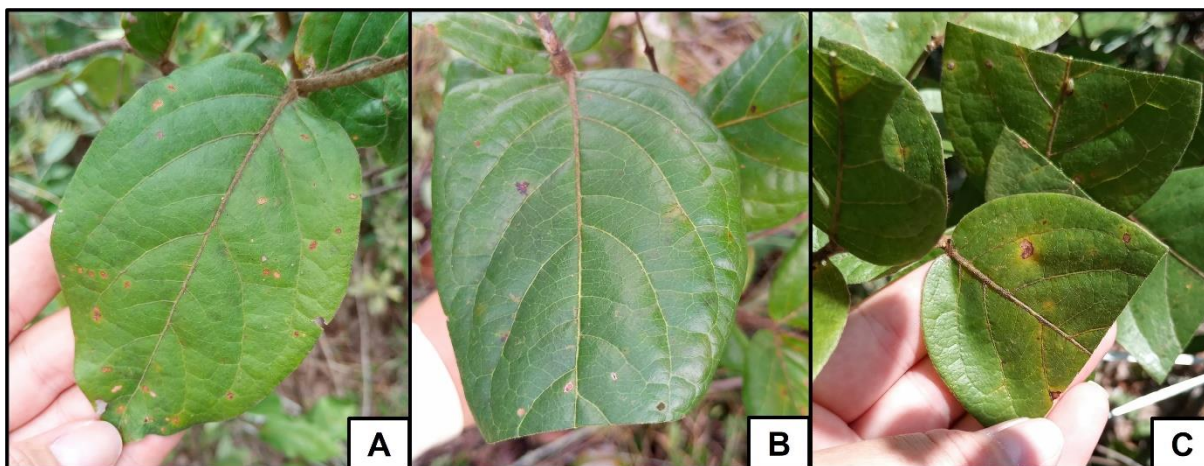
**Figura 1.** *Banisteriopsis malifolia* (Malpighiaceae) na Reserva Ecológica do Clube de Caça e Pesca Itororó de Uberlândia, no município de Uberlândia-MG. **(A)** Flor e inflorescência de *B. malifolia*. **(B)** Formiga na inflorescência de *B. malifolia*. **(C)** *Ectatomma tuberculatum* nos NEFs das brácteas da inflorescência de *B. malifolia*. Fotos de Kleber Del Claro.

## 2.2 Design Experimental

Devido a pandemia causada pela Covid-19, ao final de janeiro de 2021, foram selecionadas 75 plantas com características fenológicas semelhantes, com pelo menos cinco metros de distância umas das outras. Essas plantas foram igualmente divididas em três grupos,

de 25 plantas cada: Controle – nenhuma manipulação experimental foi feita e, portanto, os danos foliares foram naturais (<5% da área foliar total); T15 – foi removida 15% da área apical de todas as folhas de todas as plantas através da simulação de herbivoria por cortes; T50 – foi removida 50% da área de todas as folhas de todas as plantas também através de cortes. A porcentagem de dano nas folhas foi feita através de estimativa de porcentagem visual, por quadrantes. Dividimos a folha em quatro, onde cada parte equivalia a 25%, dessa forma conseguimos estimar qual a porcentagem de herbivoria das folhas. Em condições naturais, a taxa de herbivoria foliar dessa espécie é em média de 3,48% (desvio padrão: 2,01; n = 10 plantas). Assim, para avaliar o poder de indução e os efeitos na planta e nas formigas associadas, nós aumentamos os valores dos danos em aproximadamente 5 vezes (grupo T15) e 15 vezes (grupo T50). Valores de 15% de herbivoria podem ser vistos regularmente no campo, enquanto valores de 50% são vistos raramente. Entretanto, ambos podem ocorrer. Os cortes foram feitos em todas as folhas presentes na planta, independentemente do estágio ontogenético; porém, a maioria das folhas estavam em estágio intermediário ou de expansão total, maduras. Os cortes eram feitos com uma tesoura sem ponta, sempre transversalmente em relação ao comprimento da folha, ou seja, no meio do limbo foliar em T50 e na ponta do limbo foliar em T15 (Figura 2). Novos cortes foram feitos à medida que a planta apresentava brotação foliar, que ocorre até o início do estágio reprodutivo, em meados de março (Ferreira & Torezan-Silingardi 2013). Os cortes foram feitos sempre de manhã entre 8:00 e 12:00 horas.





**Figura 2.** Tratamentos com simulação de herbivoria foliar em *Banisteriopsis malifolia*. **(A)** Grupo Controle - folhas sem nenhuma manipulação experimental, dano foliar inferior a 5%. **(B)** Grupo T15 - folhas com 15% de dano. **(C)** Grupo T50 - folhas com 50% de dano. Fotos da autora.

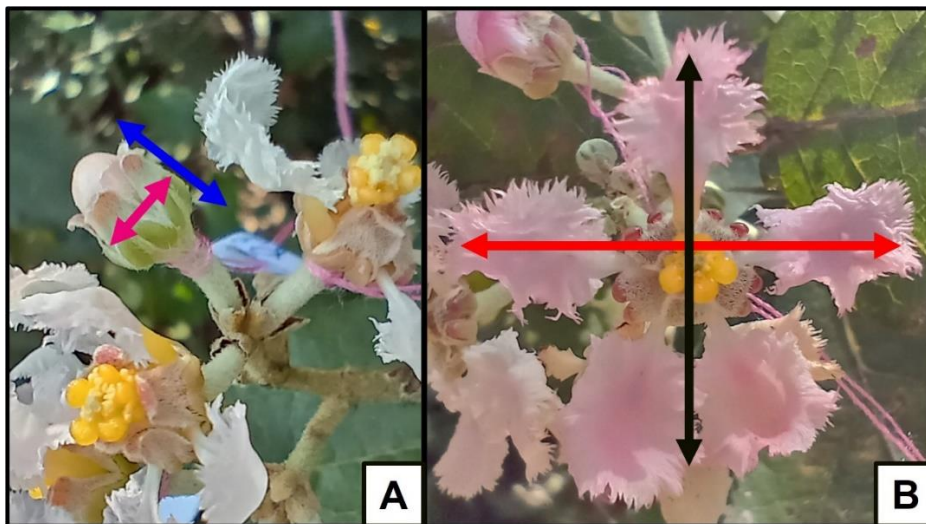
### 2.3 Nectários Extraflorais e Formigas

Foi avaliada a produtividade dos NEFs para verificar sua resposta aos níveis de herbivoria, e para correlacionar a abundância e a riqueza de formigas com a quantidade (volume) e/ou qualidade (concentração de açúcar) do néctar. Para isso, durante a fase de produção de botões florais (meados de abril), foram selecionadas três brácteas, uma em cada inflorescência. Cada bráctea possuía um par de NEFs ativos em sua base na parte abaxial, um em cada lado da nervura central. Os dois NEFs foram lavados com água destilada, secados com papel filtro e ensacados com saco de voil (Lange *et al.* 2017). Esse procedimento foi feito de manhã, entre 8:00 e 11:00, e o néctar só foi avaliado 24 h depois. O volume do néctar de ambos os NEFs foram medidos através de microcapilar graduado de 5  $\mu$ L, e a porcentagem em Brix de açúcar foi medida com refratômetro manual (modelo Eclipse) com medição de até 50%. No momento de avaliação do néctar extrafloral, foram quantificadas a abundância e riqueza de formigas em toda a planta.

### 2.4 Traços florais

Foi avaliada a variação dos traços florais de cada planta. Para isso, primeiramente foram

selecionados cinco botões de uma inflorescência por planta, os quais foram ensacados com saco de tecido voil. Então, em fase de pré-antese, foi avaliado a altura e o diâmetro de cada botão (Figura 3A). Os botões foram ensacados novamente para prevenir o ataque de herbívoros, sendo retomadas as análises após a antese. Após a antese dos cinco botões selecionados, foi analisado o tamanho (largura e comprimento) das flores (Figura 3B). Ambos foram medidos com paquímetro digital. Foi quantificado o número total de inflorescências por planta e o número de flores por inflorescência em três inflorescências previamente selecionadas. O número total de inflorescências por planta foi contabilizado no pico da florada da planta que ocorre em maio, assim como o número de flores por inflorescência. Em observações prévias de campo, foi notado que as flores não duram mais do que três dias, sendo que no final do primeiro dia já apresentam mudanças de coloração e morfologia das estruturas. Sendo assim, foram quantificados todos os botões e flores para avaliar o número total de flores por inflorescência.



**Figura 3.** (A) Botão em pré-antese, as setas indicam as direções que foram medidos a altura (seta azul) e o diâmetro (seta rosa) dos botões. (B) Flor aberta, as setas indicam como foram medidas a largura (seta vermelha) e o comprimento (seta preta) das flores, após a antese. Fotos da autora.

## 2.5 Sucesso reprodutivo

Para avaliação do sucesso reprodutivo das plantas, foram avaliados o número de

samarídeos produzidos por flores nas três inflorescências previamente selecionadas para o estudo de traços florais, e foram coletados no mínimo cinco samarídeos por inflorescência para avaliação do tamanho e peso. O tamanho dos samarídeos foi realizado através de fotos, os quais foram avaliados no programa ImageJ, e o peso foi mensurado em balança digital analítica com quatro dígitos (Uni Bloc/ ATY224), antes e após serem secos em estufa (período de 24h a 55°C).

## **2.6 Análise dos dados**

Todas as análises foram feitas utilizando o software R 4.1.1 (R Core Team 2019) a 5% de probabilidade. Foram utilizados os seguintes pacotes nas análises: ‘glmmTMB’ (Brooks *et al.* 2017), ‘car’ (Fox & Weisberg 2014), ‘emmeans’ (Lenth 2020), ‘lme4’ (Bates *et al.* 2015) e ‘multcomp’ (Hothorn *et al.* 2008).

### **2.6.1 Nectários Extraflorais e Formigas**

Para avaliar se o volume e concentração de néctar são influenciados pela intensidade de dano foliar, foi conduzido um modelo linear generalizado misto (GLMM) com distribuição gaussiana, onde o volume ou a concentração de néctar foram considerados a variável resposta, e os tratamentos o efeito fixo. Os indivíduos de plantas foram ajustados como efeito aleatório. Visto que o volume de néctar não diferiu entre os tratamentos, foi conduzida uma análise usando apenas a concentração de açúcar do néctar para analisar o efeito da interação entre os tratamentos e a concentração de açúcar na abundância e riqueza de formigas. Para isso, foi ajustado um modelo linear generalizado (GLM) com distribuição binomial negativa, a fim de controlar a superdispersão dos dados. A abundância ou a riqueza de formigas foram ajustadas como variável resposta e os tratamentos, a concentração, e a interação entre os tratamentos e a concentração de açúcar do néctar foram ajustadas como efeito fixo. As plantas foram ajustadas como efeito aleatório. Além disso, para realização dessa análise tivemos que fazer a média por

planta da concentração de açúcar do néctar, devido ao fato de termos mais de um dado coletado para NEFs e somente um dado coletado para formigas. Por fim, para analisar a influência da interação entre os tratamentos e a abundância e riqueza de formigas no total de samarídeos produzidos, foi ajustado um modelo linear generalizado (GLM) com distribuição gaussiana. O total de samarídeos produzidos foi ajustado como variável resposta e a abundância, a riqueza, e a interação entre os tratamentos e a abundância e riqueza foram ajustados como efeito fixo. As plantas foram ajustadas como efeito aleatório.

### **2.6.2 Traços florais**

Para verificar se a simulação de herbivoria interferiu no tempo de aparecimento das inflorescências e das flores, foi conduzido um GLM com distribuição gaussiana, onde os dias para o aparecimento das inflorescências e antese da primeira flor após aparecimento das inflorescências foram considerados a variável resposta e os tratamentos o efeito fixo. Para saber se houve diferença entre os tratamentos no total de inflorescências produzidas por planta, foi utilizado um GLM com distribuição gaussiana, onde o total de inflorescências foi considerado a variável resposta e os tratamentos o efeito fixo. Para verificar se a simulação de herbivoria influenciou em cada um dos traços florais da planta (altura e diâmetro dos botões, comprimento e largura das flores, tamanho da inflorescência, número de flores produzidas por inflorescências e produção de flores em função do tamanho da inflorescência), foi conduzido um GLMM com distribuições de erro de acordo com o tipo de variável resposta. Cada traço floral foi ajustado como variável resposta, os tratamentos foram ajustados como efeitos fixos, e os indivíduos de plantas como efeito aleatório controlando a dependência espacial dos dados.

### **2.6.3 Sucesso reprodutivo**

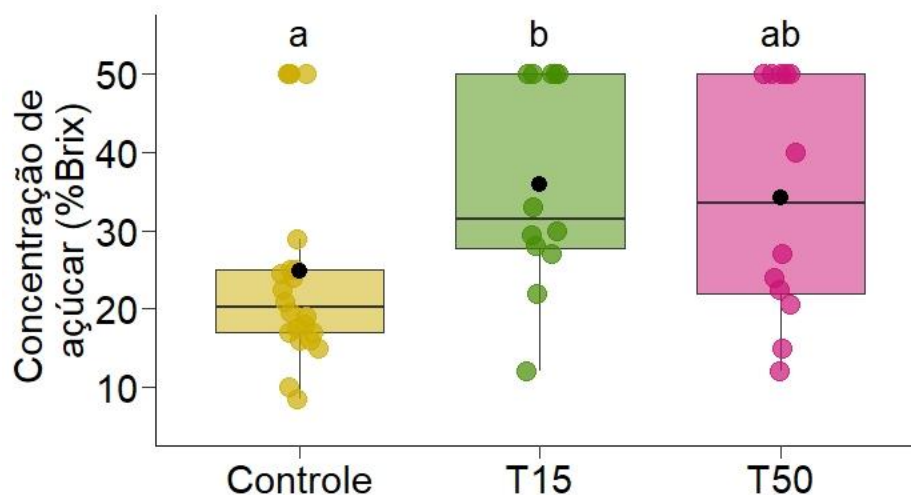
Para avaliar os componentes relacionados ao sucesso reprodutivo da planta (peso

natural, peso seco e área dos samarídeos, frutos formados por flores e frutos formados por inflorescência), foi conduzido um GLMM com distribuições de erro de acordo com o tipo de variável resposta. Cada componente foi ajustado como variável resposta, os tratamentos foram ajustados como efeitos fixos, e os indivíduos de plantas como efeito aleatório controlando a dependência espacial dos dados.

### **3 – RESULTADOS**

#### **3.1 Nectários Extraflorais e Formigas**

Maiores danos foliares não influenciaram o volume de néctar extrafloral ( $\chi^2 = 0.49, p = 0.7819, R^2m = 0.008, R^2c = 0.23$ ) produzido entre os tratamentos, mas o efeito foi positivo para a concentração de açúcar do néctar ( $\chi^2 = 6.99, p = 0.03, R^2m = 0.13, R^2c = 0.13$ , Fig. 3), havendo um aumento da concentração de açúcar quando há aumento no dano foliar. Plantas T15 tiveram uma concentração de açúcar 1.45 vezes maior (*média* = 36.0 [intervalo de confiança (CI) de 95%: 28.2, 43.7]) que plantas sem simulação de herbivoria (*média* = 24.8 [95% CI: 19.0, 30.5]); plantas T50 (*média* = 34.2 [95% CI: 26.5, 42.0]) não diferiram significativamente de nenhum dos dois tratamentos (Fig. 4).



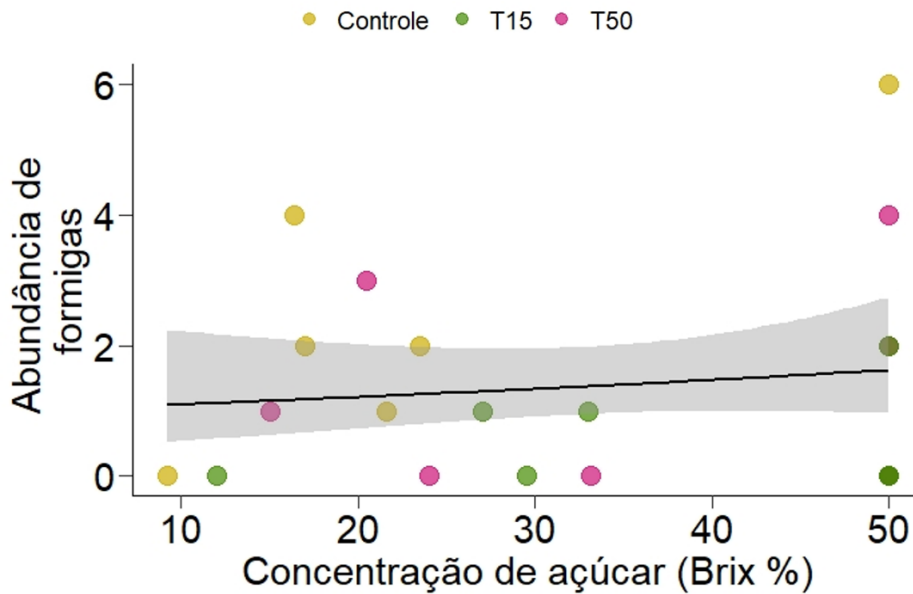
**Figura 4.** Variação da concentração de açúcar do néctar extrafloral produzido pelos nectários extraflorais em plantas de *Banisteriopsis malifolia* (Malpighiaceae) sem (Controle) e com simulação de herbivoria (T15, T50). T15 – plantas com 15% de simulação de herbivoria; T50 – plantas com 50% de simulação de herbivoria. Diferentes letras representam diferença estatística pela média marginal estimada. Figuras representam box-plots com dados brutos (pontos coloridos), e média (ponto preto).

Foi observado um total de nove espécies de formigas forrageando as plantas, no momento de coleta do néctar. Dessas, seis espécies foram vistas nos tratamentos Controle e T15 e somente duas espécies foram constatadas em T50 (Tabela 1). Plantas sem simulação de herbivoria apresentaram grande quantidade de formigas da espécie *Ectatomma tuberculatum* (59%), assim como plantas T50 (65%). Ao contrário das plantas T15, que não apresentaram formigas dessa espécie no momento da avaliação; porém, encontramos formigas de outras espécies, como a espécie *Wasmannia sp.* (44%) sendo a de maior abundância relativa. Além disso, observamos que em plantas T50 somente duas espécies de formigas apareceram no momento da avaliação, sendo elas: *E. tuberculatum* e *Camponotus sp.*

**Tabela 1.** Espécies de formigas, abundância absoluta (Aab) e abundância relativa (Are) de formigas encontradas nas plantas de *Banisteriopsis malifolia* (Malpighiaceae), sem (Controle) e com (T15, T50) simulação de herbivoria.

Espécies de Formigas	Controle		T15		T50	
	Aab	Are	Aab	Are	Aab	Are
<i>Azteca sp.</i>	0	-	2	14 %	0	-
<i>Brachymyrmex sp.</i>	0	-	1	7 %	0	-
<i>Camponotus sp.</i>	2	7 %	2	14 %	5	35 %
<i>Dolichoderus sp.</i>	4	14 %	1	7 %	0	-
<i>Ectatomma tuberculatum</i> (Olivier, 1792)	16	59 %	0	-	9	65 %
<i>Ectatomma sp.</i>	2	7 %	0	-	0	-
<i>Pseudomyrmex sp.</i>	3	10 %	0	-	0	-
<i>Tapinoma sp.</i>	1	3 %	2	14 %	0	-
<i>Wasmannia sp.</i>	0	-	6	44 %	0	-

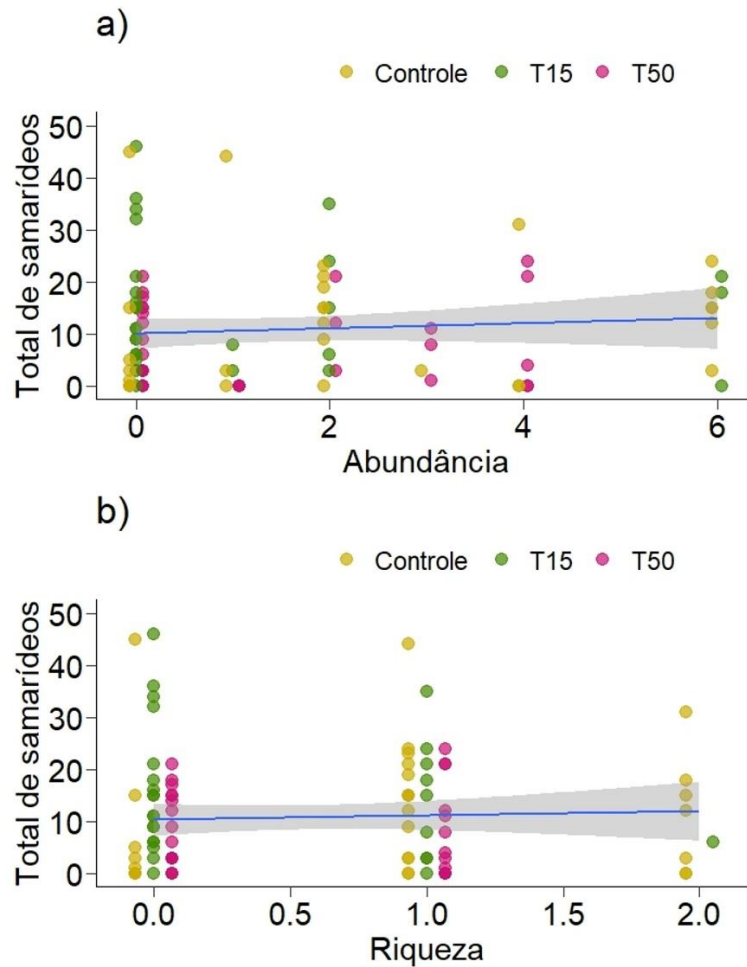
Visto que os tratamentos influenciam a concentração de açúcar do néctar, foi analisada a influência da interação entre os tratamentos e a concentração de açúcar na abundância e riqueza de formigas. Observou-se que não houve influência da interação entre os tratamentos e a concentração de açúcar do néctar extrafloral na abundância de formigas ( $\chi^2 = 1.335$ ,  $p = 0.512$ ). Entretanto, as análises de efeito simples do modelo (ou seja, tratamentos e concentração de açúcar analisados separadamente, influenciando a abundância de formigas) mostraram que tanto tratamento ( $\chi^2 = 11.650$ ,  $p = 0.002$ ), quanto concentração ( $\chi^2 = 4.053$ ,  $p = 0.044$ ; Fig. 5) influenciam a abundância de formigas na planta. Constatou-se que para cada uma unidade de aumento na concentração de açúcar do néctar, há um aumento de 1.03 de formigas na planta; visto que a relação entre concentração de açúcar e formiga é positiva (*média* = 1.24 [95% CI: 0.733, 2.09]). De igual forma, não houve influência da interação dos tratamentos com a concentração de açúcar na riqueza de formigas na planta ( $\chi^2 = 0.7989$ ,  $p = 0.6707$ ). As análises de efeito simples do modelo (Tratamentos: ( $\chi^2 = 3.618$ ,  $p = 0.1637$ ); Concentração de açúcar do néctar: ( $\chi^2 = 0.3167$ ,  $p = 0.5736$ )), também não influenciaram a riqueza de formigas.



**Figura 5.** Interação entre os tratamentos e a concentração de açúcar do néctar extrafloral produzido pelos nectários extraflorais na abundância de formigas em plantas de *Banisteriopsis malifolia* (Malpighiaceae) sem (Controle) e com simulação de herbivoria (T15, T50).

Como a análise anterior mostrou que os tratamentos influenciam a abundância de formigas na planta, foi conduzida uma interação entre os tratamentos e a abundância de formigas no total de samarídeos produzidos. Não houve influência da interação entre os tratamentos e a abundância ( $\chi^2 = 0.4452$ ,  $p = 0.5046$ ) de formigas na planta no total de samarídeos produzidos, nem influência significativa do efeito simples do modelo para abundância ( $\chi^2 = 0.3955$ ,  $p = 0.5294$ ). Entretanto, houve influência para os tratamentos no total de samarídeos produzidos ( $\chi^2 = 4.0751$ ,  $p = 0.04$ ; Fig. 6a). Nem a riqueza ( $\chi^2 = 0.004$ ,  $p = 0.9468$ ), nem a interação dos tratamentos com a riqueza de formigas ( $\chi^2 = 0.1397$ ,  $p = 0.7085$ ) influenciaram o total de samarídeos produzidos, somente os tratamentos ( $\chi^2 = 3.8163$ ,  $p = 0.05$ ; Fig. 6b).



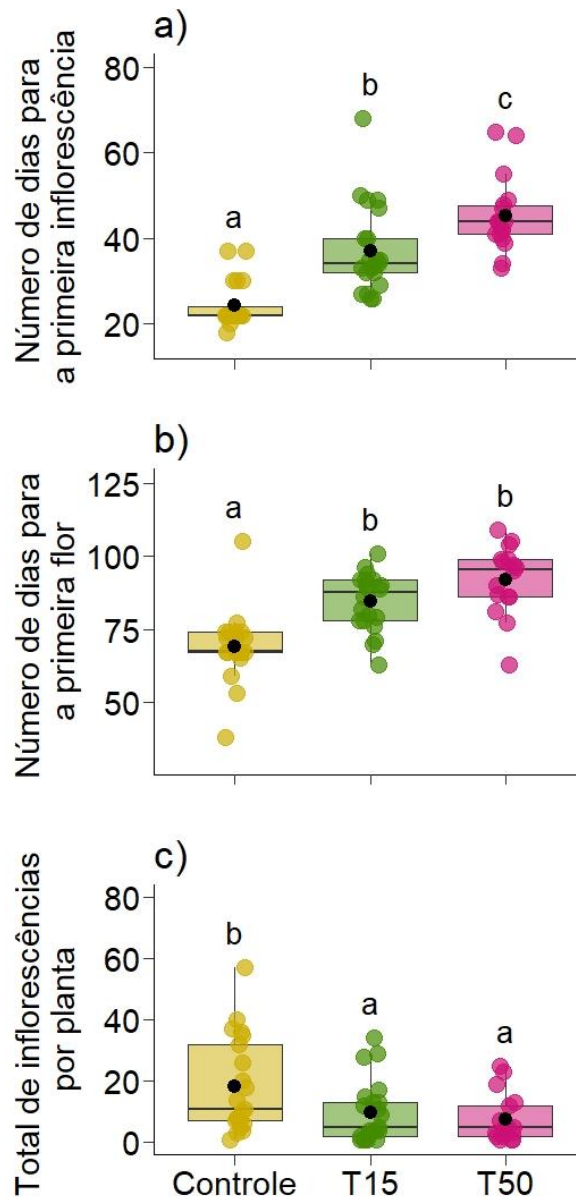


**Figura 6.** Interação entre os tratamentos e (a) abundância e (b) riqueza de formigas na planta no total de samarídeos produzidos, em plantas de *Banisteriopsis malifolia* (Malpighiaceae) sem (Controle) e com simulação de herbivoria (T15, T50).

### 3.2 Traços Florais

A simulação de herbivoria retardou o aparecimento das inflorescências ( $\chi^2 = 63.21$ ,  $p < 0.001$ ,  $R^2m = 0.52$ ,  $R^2c = 0.52$ , Fig. 7a) e das primeiras flores ( $\chi^2 = 42.04$ ,  $p < 0.001$ ,  $R^2m = 0.43$ ,  $R^2c = 0.43$ , Fig. 7b). Plantas T15 (37.1 [95% CI: 33.6, 40.7]) e T50 (45.3 [95% CI: 41.5, 49.2]) demoraram em média 13 e 21 dias, respectivamente, a mais que plantas controle (24.4 [95% CI: 20.7, 28.1]) para produzir inflorescências (Fig. 7a). Além disso, plantas T50 demoraram cerca de oito dias a mais que plantas T15 para começarem a produzir inflorescências, indicando que à medida que os danos aumentaram, o tempo para produção de inflorescências também aumentou. Plantas T15 (*média* = 84.4 [95% CI: 79.5, 89.3]) e T50

(*média* = 92.0 [95% CI: 86.5, 97.5]) também demoraram mais tempo para produzir as primeiras flores do que plantas Controle (*média* = 69.0 [95% CI: 64.0, 73.9], Fig. 7b), cerca de 15 e 23 dias a mais, respectivamente. Plantas T50 demoraram cerca de oito dias a mais que plantas T15 para produzir suas primeiras flores. Os resultados mostraram diferença significativa entre os tratamentos, no total de inflorescências produzidas por planta ( $\chi^2 = 9.4277$ ,  $p = 0.008$ ,  $R^2m = 0.13$ ,  $R^2c = 0.13$ , Fig. 7c). Plantas Controle (*média* = 18.33 [95% CI: 13.29, 23.4]) produziram 1.85 vezes mais inflorescências que T15 (*média* = 9.90 [95% CI: 4.86, 14.9]) e 2.39 vezes mais que T50 (*média* = 7.65 [95% CI: 2.04, 13.3]).



**Figura 7.** Variação na (a) diferença (em dias) entre a simulação de herbivoria e o aparecimento da primeira inflorescência, (b) diferença (em dias) entre a simulação de herbivoria e o desabrochar da primeira flor e (c) total de inflorescências por planta em plantas de *Banisteriopsis malifolia* (Malpighiaceae) sem (Controle) e com simulação de herbivoria (T15, T50). Diferentes letras em (a), (b) e (c) representam diferença estatística pela média marginal estimada. Figuras representam box-plots com dados brutos (pontos coloridos), e média (ponto preto).

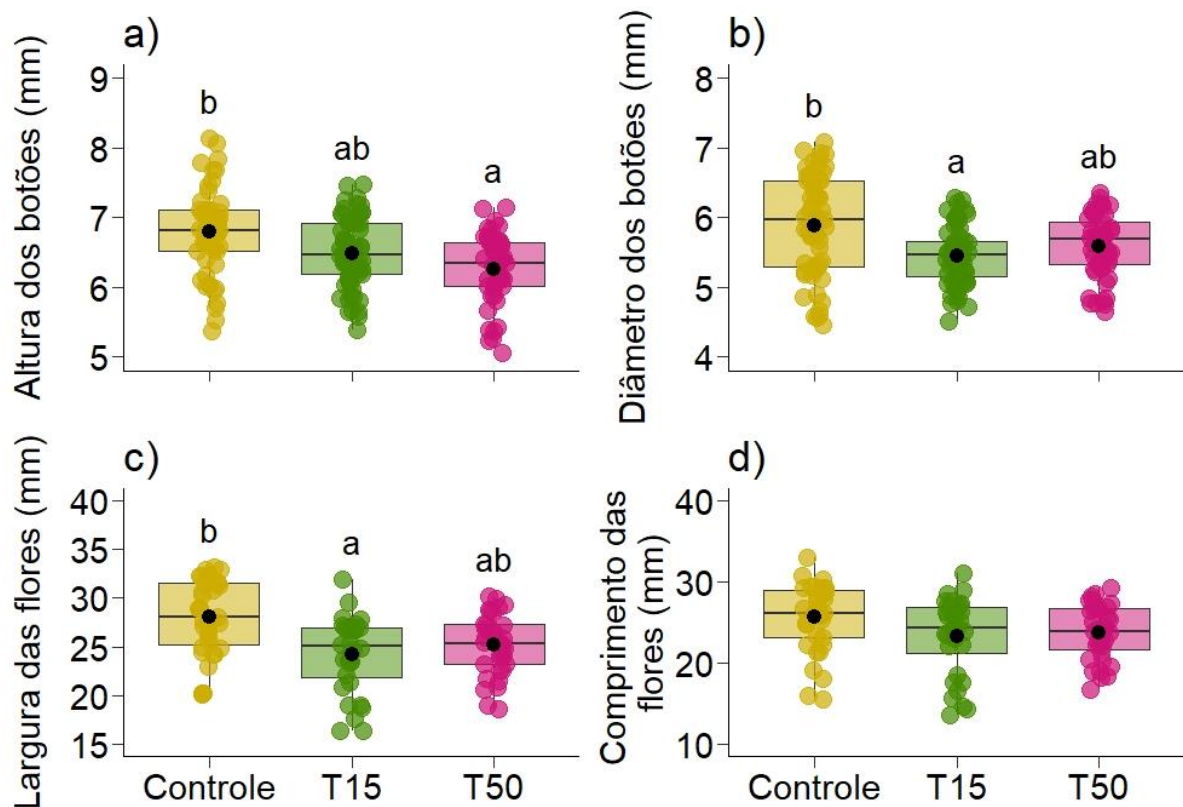
Plantas com herbivoria simulada (T15, T50) desenvolveram botões e flores menores que plantas sem herbivoria simulada (Controle) (Tabela 2, Fig. 8). A altura dos botões foram 1.04 e 1.09 vezes menor em T15 e T50, respectivamente, do que em Controle (Fig. 8a). O

diâmetro dos botões foram 1.07 e 1.05 menores em plantas com simulação de herbivoria (T15 e T50, respectivamente) do que em plantas sem (Controle) simulação de herbivoria (Fig. 8b). A largura das flores foram 1.13 e 1.10 vezes menores nos tratamentos (T15 e T50, respectivamente) do que em Controle (Fig. 8c). Além disso, observamos, que a altura dos botões foi menor em T50 (*effect.size*: Controle – T50 = 1.448; T15 – T50 = 0.834, Tabela 2) e o diâmetro menor em T15 (*effect.size*: Controle – T15 = 0.425; T15 – T50 = - 0.130, Tabela 2) quando comparamos os tratamentos. A largura das flores mostrou-se menor em T15 (*effect.size*: Controle – T15 = 1.165; T15 – T50 = - 0.221, Tabela 2), enquanto o comprimento das flores não diferiu entre os tratamentos (Fig. 8d).

**Tabela 2.** Valores de  $\chi^2$ ,  $p$ , R marginal e R condicional de cada traço floral e, média e intervalo de confiança (CI) (95%) dos traços florais entre os tratamentos em plantas de *Banisteriopsis malifolia* (Malpighiaceae) sem (Controle) e com simulação de herbivoria (T15, T50).

Traços Florais	$\chi^2$	$p$	R <sup>2</sup> m	R <sup>2</sup> c	Tratamentos	Média	CI (95%) LI, LS*
<b>Altura dos botões</b>	9.3719	0.009	0.13	0.58	Controle	6.76	6.49, 7.03
					T15	6.50	6.24, 6.76
					T50	6.15	5.87, 6.43
<b>Diâmetro dos botões</b>	5.9038	0.05	0.09	0.61	Controle	5.88	5.63, 6.14
					T15	5.46	5.22, 5.70
					T50	5.59	5.32, 5.85
<b>Largura das flores</b>	7.5617	0.02	0.13	0.48	Controle	27.8	26.0, 29.5
					T15	24.6	22.9, 26.2
					T50	25.2	23.3, 27.0
<b>Comprimento das flores</b>	1.8328	0.399	0.03	0.54	Controle	25.2	23.0, 27.4
					T15	23.2	21.2, 25.3
					T50	23.8	21.5, 26.1

\*LI (Limite inferior), LS (Limite superior).



**Figura 8.** Variação na (a) altura dos botões, (b) diâmetro dos botões, (c) largura das flores e (d) comprimento das flores (em milímetros) em plantas de *Banisteriopsis malifolia* (Malpighiaceae) sem (Controle) e com simulação de herbivoria (T15, T50). Diferentes letras em (a), (b) e (c) representam diferença estatística pela média marginal estimada. Figuras representam box-plots com dados brutos (pontos coloridos), e média (ponto preto).

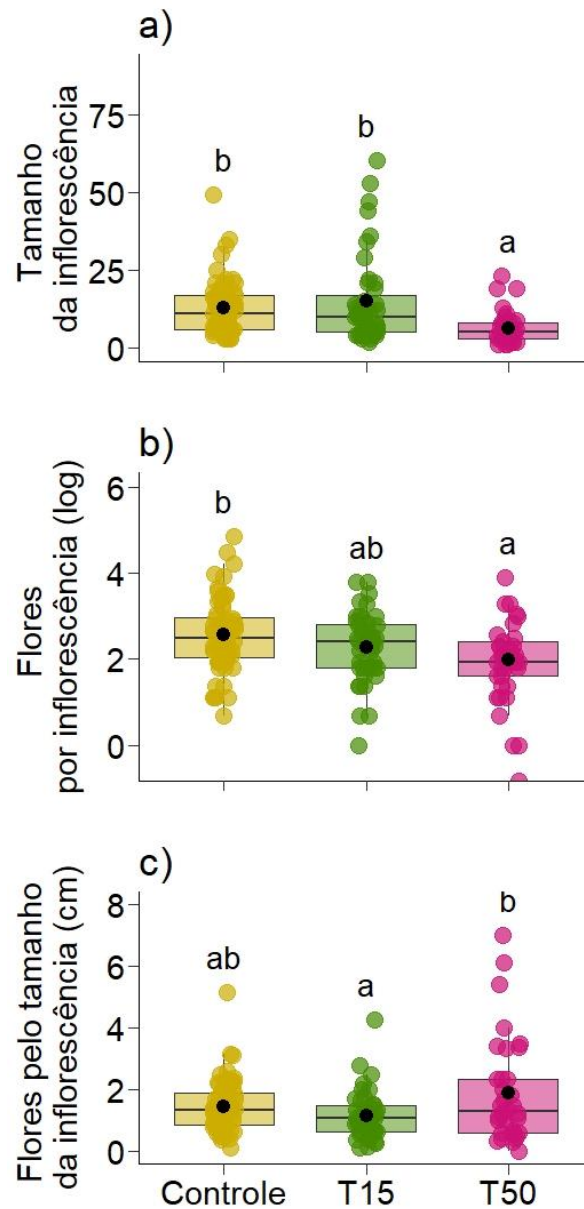
A simulação de herbivoria influenciou significativamente no tamanho das inflorescências produzidas. Plantas T50 produziram inflorescências 6.23 vezes menores que plantas Controle e 8.54 vezes menores que plantas T15; plantas Controle e T15 não diferiram entre si (Tabela 3, Fig. 9a). O número de flores produzidas por inflorescência também foi menor em T50. Plantas T50 produziram 7.63 vezes menos flores por inflorescência que plantas Controle; ao analisar plantas com 15 % de herbivoria simulada, observamos que o número de flores produzidas não difere dos outros tratamentos, pois há sobreposição de valores (Tabela 3, Fig. 9b). Quando consideramos o tamanho da inflorescência na produção de flores, observamos que plantas T15 diferem de T50; porém, plantas Controle não diferem de nenhum dos dois

tratamentos com simulação de herbivoria (Tabela 3, Fig. 9c).

**Tabela 3.** Valores de  $\chi^2$ ,  $p$ , R marginal e R condicional de cada variável e, média e intervalo de confiança (CI) (95%) das variáveis entre os tratamentos em plantas de *Banisteriopsis malifolia* (Malpighiaceae) sem (Controle) e com simulação de herbivoria (T15, T50).

Variáveis	$\chi^2$	$p$	R <sup>2</sup> m	R <sup>2</sup> c	Tratamentos	Média	CI (95%) LI, LS*
<b>Tamanho da</b>					Controle	12.67	9.95, 15.38
<b>Inflorescência</b>	13.232	0.001	0.09	0.15	T15	14.98	11.77, 18.18
					T50	6.44	2.91, 9.98
<b>Flores por</b>					Controle	15.62	11.84, 20.6
<b>Inflorescência</b>	9.333	0.009	0.14	0.86	T15	11.19	8.32, 15.0
					T50	7.99	5.69, 11.2
<b>Flores pelo</b>					Controle	1.46	1.125, 1.80
<b>Tamanho da</b>	5.988	0.05	0.05	0.25	T15	1.16	0.774, 1.54
<b>Inflorescência</b>					T50	1.87	1.437, 2.30

\*LI (Limite inferior), LS (Limite superior).

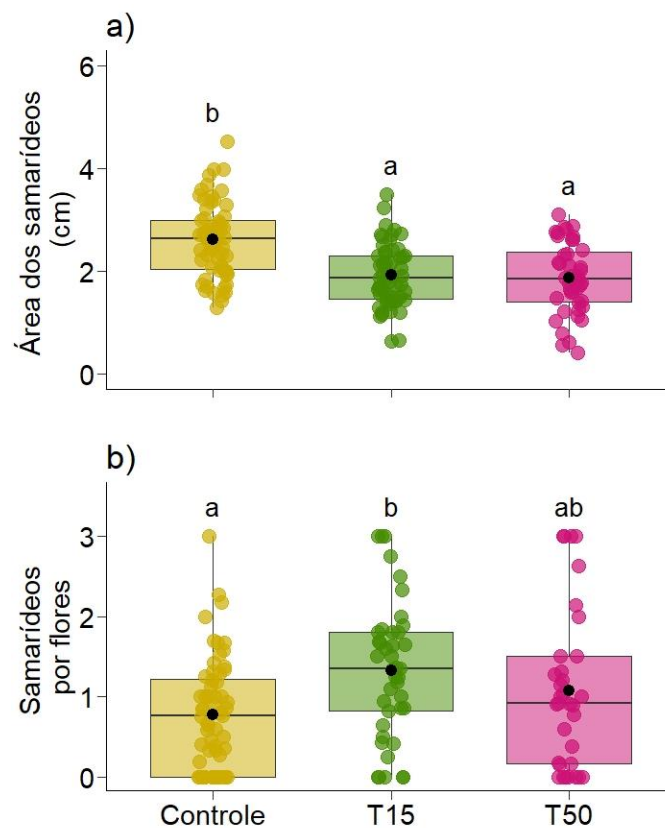


**Figura 9.** Variação do (a) tamanho das inflorescências (em centímetros), (b) log do número de flores por inflorescência e (c) flores produzidas em função do tamanho da inflorescência em plantas de *Banisteriopsis malifolia* (Malpighiaceae) sem (Controle) e com simulação de herbivoria (T15, T50). Diferentes letras em (a), (b) e (c) representam diferença estatística pela média marginal estimada. Figuras representam box-plots com dados brutos (pontos coloridos), e média (ponto preto).

### 3.3 Sucesso Reprodutivo

A simulação de herbivoria não influenciou no peso natural ( $\chi^2 = 1.8647, p = 0.3936$ ) e no peso seco ( $\chi^2 = 2.1033, p = 0.3494$ ) dos samarídeos, mas influenciou significativamente no tamanho dos samarídeos ( $\chi^2 = 16.262, p < 0.001, R^2m = 0.20, R^2c = 0.55$ , Fig. 10a). Plantas

com herbivoria foliar (T15: *média* = 1.95 [95% CI: 1.67, 2.24]; T50: *média* = 1.83 [95% CI: 1.52, 2.15]) produziram frutos 1.33 e 1.42 vezes menores (T15 e T50, respectivamente) em comparação com as plantas Controle (*média* = 2.60 [95% CI: 2.33, 2.88]). Ao analisar os samarídeos produzidos por flor ( $\chi^2 = 7.3931$ ,  $p = 0.02$ ,  $R^2m = 0.08$ ,  $R^2c = 0.40$ ), observamos que plantas T15 (*média* = 1.330 [95% CI: 1.02, 1.64]) produziram mais samarídeos que plantas T50 (*média* = 1.094 [95% CI: 0.75, 1.43]) e Controle (*média* = 0.775 [95% CI: 0.50, 1.04]; Fig. 10b). O número de samarídeos produzidos por inflorescência ( $\chi^2 = 4.0524$ ,  $p = 0.13$ ) não diferiu entre os tratamentos.



**Figura 10.** Variação na (a) área dos samarídeos coletados (em centímetros) e (b) número de samarídeos produzidos por flores em plantas de *Banisteriopsis malifolia* (Malpighiaceae) sem (Controle) e com simulação de herbivoria (T15, T50). Diferentes letras representam diferença estatística pela média marginal estimada. Figuras representam box-plots com dados brutos (pontos coloridos), e média (ponto preto).



#### 4 – DISCUSSÃO

A principal hipótese desse estudo foi comprovada, diferentes níveis de dano foliar influenciam a produção de NEFs, os padrões de forrageamento das formigas e o sucesso reprodutivo da planta. As predições foram totais ou parcialmente comprovadas: i) baixos níveis de dano foliar, inferiores a 5%, não foram suficientes a ponto de gerar variações no comportamento das formigas, aumentando sua visitação às plantas, nem nos componentes reprodutivos da planta. Além disso, plantas Controle não diferiram quando os danos foliares foram superiores a 50% (T50) na concentração de açúcar do néctar produzido. ii) níveis intermediários de dano foliar, de 15% (T15), apresentaram efeito positivo no comportamento das formigas, aumentando a abundância desses insetos nas plantas, fato positivamente relacionado a um aumento na concentração de açúcar dos NEFs, caracterizando uma defesa induzida (semelhante a Calixto *et al.* 2020). Com o aumento da herbivoria, houve um retardo no aparecimento das inflorescências e flores, além de produzirem botões, flores e frutos menores (Cozzolino *et al.* 2015, Rusman *et al.* 2019). Porém, há indícios de compensação pelas plantas, pois plantas com níveis intermediários de herbivoria, produziram mais inflorescências e inflorescências maiores que plantas com perda foliar de 50% além de produzirem mais frutos por flor (Boege 2005, Quijano-Medina *et al.* 2019). A herbivoria intermediária (T15), também resultou em uma maior concentração de açúcar nos NEFs, mas não em maior volume. iii) altos níveis de dano foliar possivelmente afetaram a alocação de recursos da planta, retirando recursos da reprodução e alocando em defesa, resultando em inflorescências, botões, flores e frutos menores e, na produção de menos inflorescências (Rusman *et al.* 2019). Além disso, plantas T50 tiveram um atraso em dias para o aparecimento de suas inflorescências e flores (Fig. 7a, b). Não produziram maior volume e concentração de açúcar nos NEFs do que nos danos menores (Fig. 4).

O aumento na herbivoria foliar induziu uma resposta nas plantas, investindo em maior

concentração de açúcar dos NEFs, consequentemente atraindo mais formigas (Calixto, Lange, Bronstein, *et al.* 2021). Porém, não houve aumento no volume de néctar em nenhum dos tratamentos. Nesse caso, a planta pode ter investido em aumentar a concentração de açúcar dos NEFs e não o volume após os danos sofridos, isso por que a qualidade do néctar pode atrair formigas mais agressivas para proteger a planta (Pacelhe *et al.* 2019). Plantas T15 tiveram maior concentração de açúcar do que os outros tratamentos, plantas Controle e T50 não diferiram entre si. Esse resultado difere de outros estudos em que a concentração de açúcar do NEF aumenta com a intensidade do dano causado à planta (Raupp *et al.* 2020, Calixto, Lange, Bronstein, *et al.* 2021); talvez no caso de *B. malifolia*, altos níveis de herbivoria não sejam suportados pela planta, fazendo com que esta chegue ao seu limite, não produzindo néctar com alta concentração de açúcar com o aumento da intensidade do dano, mais estudos nesse sentido devem ser feitos para explicar o porque deste resultado.

Plantas com herbivoria foliar atraíram mais formigas, assim como a concentração de açúcar do néctar extrafloral (Fig. 4). A herbivoria pode induzir um aumento na concentração de açúcar do NEF e liberar VOCs que podem atrair mais formigas para a planta (Calixto, Lange, Bronstein, *et al.* 2021). Pacelhe *et al.* (2019) mostraram que a qualidade do néctar afeta a agressividade das formigas presentes na planta. Além disso, 65% de formigas da espécie *E. tuberculatum* foram observadas em plantas com altos níveis de herbivoria foliar (T50), tais plantas mostraram a presença de somente duas formigas, sendo elas: *E. tuberculatum* e *Camponotus sp.* (Tabela 1), ambas formigas agressivas e eficazes na proteção de plantas portadoras de NEFs (Baker-Méio & Marquis 2012, Anjos *et al.* 2017, Fagundes *et al.* 2017). Sugere-se que a predominância de *E. tuberculatum* nas plantas, uma das formigas de maior tamanho e agressividade no cerrado, possa ter papel relevante nesses resultados. Essa espécie de formiga costuma monopolizar a planta. Tal agressividade, pode espantar outras formigas da planta (Wheeler 1986, Melati & Leal 2018). Esse pode ser o fator determinante para plantas

T50 apresentarem somente duas espécies de formigas, muito provavelmente, quando a planta é submetida a altos níveis de dano foliar, libera voláteis que irão atrair formigas mais agressivas, o que poderia explicar o fato de serem encontradas somente espécies agressivas e muito agressivas em T50. Os resultados indicam que quando a planta sofre altos níveis de herbivoria foliar ela atrai formigas mais agressivas para se proteger do ataque de herbívoros (Fagundes *et al.* 2017, Raupp *et al.* 2020).

Diferentes intensidades de danos foliares afetam os traços florais da planta, demorando mais tempo para produzir inflorescências e flores, produzindo menos inflorescências por planta e botões e flores menores (Mothershead & Marquis 2000). Isso ocorre devido a diminuição de fotossintatos pela planta e potencial realocação de recursos, resultando em menor investimento de recursos para a reprodução e desenvolvimento em plantas T15 e principalmente em T50 (Trager *et al.* 2010). Esse fenômeno é denominado custo resultante de defesa do crescimento (Growth-Defense Trade-off) (Boege & Marquis 2005), isso é sugerido pelos resultados desse estudo, onde plantas com altos níveis de dano foliar produziram inflorescências, botões, flores e frutos menores, além de produzirem poucas inflorescências (no máx. 3 por planta). Plantas com níveis intermediários de danos (T15) tiveram um atraso na produção de suas inflorescências, mas ainda produziram antes de T50. Produziram mais flores por inflorescência e inflorescências maiores que T50, esses resultados sugerem que há compensação por parte da planta, devido ao nível de dano mais acentuado que 5% (Lucas-Barbosa 2016, Quijano-Medina *et al.* 2019). Uma maior diminuição da área fotossintética da planta prejudicou seu crescimento e reprodução vegetal (Taiz & Zeiger 2009), plantas com altos níveis de dano (T50) produziram inflorescências menores e menos flores por inflorescência. Esses resultados sugerem que a planta possivelmente realocou recursos que seriam para componentes reprodutivos para processos relacionados à proteção, ao realocar seus recursos pode faltar energia na planta, para a produção de flores e inflorescências, gerando alterações no tamanho e forma dos traços florais

da planta (Boege & Marquis 2005, Rusman *et al.* 2019).

O sucesso reprodutivo da planta também foi afetado pelos diferentes níveis de dano foliar, produzindo menos frutos por flor e frutos menores. Plantas T50 produziram menos frutos por flor que as plantas dos outros tratamentos, o que pode ser explicado devido à baixa quantidade de recursos produzidos decorrente da baixa área fotossintética, além de um potencial realocação de recursos (Mothershead & Marquis 2000). Além disso, pode ter havido um impacto da baixa produção de recursos florais na atratividade de polinizadores e um potencial impacto das formigas sobre os polinizadores (Assunção *et al.* 2014, Villamil *et al.* 2018, 2020).

Em conclusão, este estudo mostra como a intensidade de danos foliares em *B. malifolia*, uma planta com NEFs altera os padrões de secreção de néctar, o forrageamento das formigas associadas e o sucesso reprodutivo da planta, muito importante para entendermos com mais clareza os padrões de secreção dos NEFs e como a planta se comporta diante de níveis intermediários e altos de danos. Plantas sem simulação de herbivoria, não demonstraram alterações significativas em seus padrões de secreção de néctar extrafloral, no forrageamento das formigas e em seu sucesso reprodutivo. Em contrapartida, plantas com níveis médios (T15) e altos (T50) de danos foliares produziram menos inflorescências e, botões, flores e frutos menores, além de demorarem mais tempo para produzir inflorescências e flores. Além disso, plantas com níveis intermediários de danos, produziram néctar extrafloral com maior concentração de açúcar.

## 5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVARES, C. A., J. L. STAPE, P. C. SENTELHAS, J. L. DE MORAES GONÇALVES, and G. SPAROVEK. 2013. Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorol. Zeitschrift* 22: 711–728.
- ALVES-SILVA, E., G. J. BARÔNIO, H. M. TOREZAN-SILINGARDI, and K. DEL-CLARO. 2013. Foraging behavior of *Brachygastra lecheguana* (Hymenoptera: Vespidae) on *Banisteriopsis malifolia* (Malpighiaceae): Extrafloral nectar consumption and herbivore

- predation in a tending ant system. *Entomol. Sci.* 16: 162–169.
- ANJOS, D. V., B. CASERIO, F. T. REZENDE, S. P. RIBEIRO, K. DEL-CLARO, and R. FAGUNDES. 2017. Extrafloral-nectaries and interspecific aggressiveness regulate day/night turnover of ant species foraging for nectar on *Bionia coriacea*. *Austral Ecol.* 42: 317–328.
- APPOLINARIO, V., and I. SCHIAVINI. 2002. Levantamento fitossociológico de espécies arbóreas de cerrado (stricto sensu) em Uberlândia-Minas Gerais. *Bol. do Herbário Ezechias Paulo Heringer* 10.
- ASSUNÇÃO, M. A., H. M. TOREZAN-SILINGARDI, and K. DEL-CLARO. 2014. Do ant visitors to extrafloral nectaries of plants repel pollinators and cause an indirect cost of mutualism? *Flora Morphol. Distrib. Funct. Ecol. Plants* 209: 244–249.
- BAKER-MÉIO, B., and R. J. MARQUIS. 2012. Context-dependent benefits from ant-plant mutualism in three sympatric varieties of *Chamaecrista desvauxii*. *J. Ecol.* 100: 242–252.
- BAKER, H. G. 1977. Non-sugar chemical constituents of nectar. *Apidologie* 8: 349–356.
- BATES, D., M. MAECHLER, B. BOLKER, and S. WALKER. 2015. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *J. Stat. Softw.* 67: 1–48.
- BOEGE, K. 2005. Influence of plant ontogeny on compensation to leaf damage. *Am. J. Bot.* 92: 1632–1640.
- BOEGE, K., and R. J. MARQUIS. 2005. Facing herbivory as you grow up: The ontogeny of resistance in plants. *Trends Ecol. Evol.* 20: 441–448.
- BROOKS, M. E. J. K. K., K. VAN BENTHEM, A. MAGNUSSON, C. W. BERG, A. NIELSEN, H. J. SKAUG, M. MAECHLER, and B. M. BOLKER. 2017. glmmTMB balances speed and flexibility among packages for zero-inflated generalized linear mixed modeling. *R J.* 9: 378–400.
- BYK, J., and K. DEL-CLARO. 2010. Nectar- and pollen-gathering *Cephalotes* ants provide no protection against herbivory: A new manipulative experiment to test ant protective capabilities. *Acta Ethol.* 13: 33–38.
- CALIXTO, E. S., D. LANGE, J. BRONSTEIN, H. M. TOREZAN-SILINGARDI, and K. DEL-CLARO. 2021. Optimal Defense Theory in an ant-plant mutualism: extrafloral nectar as an induced defense is maximized in the most valuable plant structures. *J. Ecol.* 109: 167–178.
- CALIXTO, E. S., D. LANGE, and K. DEL-CLARO. 2015. Foliar anti-herbivore defenses in *Qualea multiflora* Mart. (Vochysiaceae): Changing strategy according to leaf development. *Flora Morphol. Distrib. Funct. Ecol. Plants* 212: 19–23.

- CALIXTO, E. S., D. LANGE, and K. DEL-CLARO. 2018. Protection mutualism: an overview of ant-plant interactions mediated by extrafloral nectaries. *Oecologia Aust.* 22: 410–425.
- CALIXTO, E. S., D. LANGE, and K. DEL-CLARO. 2021. Net benefits of a mutualism: Influence of the quality of extrafloral nectar on the colony fitness of a mutualistic ant. *Biotropica* 53: 846–856.
- CALIXTO, E. S., L. R. NOVAES, D. F. B. DOS SANTOS, D. LANGE, X. MOREIRA, and K. DEL-CLARO. 2020. Climate seasonality drives ant–plant–herbivore interactions via plant phenology in an extrafloral nectary-bearing plant community. *J. Ecol.* 1–13.
- CARPER, A. L., L. S. ADLER, and R. E. IRWIN. 2016. Effects of florivory on plant-pollinator interactions: Implications for male and female components of plant reproduction. *Am. J. Bot.* 103: 1061–1070.
- CARVALHO, P. D., A. RAPINI, and A. A. CONCEIÇÃO. 2010. Flora da Bahia: Malpighiaceae - Banisteriopsis, Bronwenia e Diplopterys. *Sitientibus série Ciências Biológicas* 10: 159–191.
- COLEY, P. D., and J. A. BARONE. 1996. Herbivory and plant defenses in tropical forests. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 27: 305–335.
- COLEY, P. D., J. LOKVAM, K. RUDOLPH, K. BROMBERG, T. E. SACKETT, L. WRIGHT, T. BRENES-ARGUEDAS, D. DVORETT, S. RING, A. CLARK, C. BAPTISTE, R. T. PENNINGTON, and T. A. KURSAR. 2005. Divergent defensive strategies of young leaves in two species of *Inga*. *Ecology* 86: 2633–2643.
- COZZOLINO, S., S. FINESCHI, M. LITTO, G. SCOPECE, J. TRUNSCHKE, and F. P. SCHIESTL. 2015. Herbivory increases fruit set in *Silene latifolia* : A consequence of induced pollinator-attracting floral volatiles? *J. Chem. Ecol.* 41: 622–630.
- CRAWLEY, M. J. 1983. *Herbivory: the dynamics of animal–plant interactions* M. J. Crawley (Ed.). Blackwell Science Publications, Oxford.
- DEL-CLARO, K. 2012. Origens e importância das relações plantas-animais para a ecologia e conservação. *In* K. Del-Claro and H. M. Torezan-Silingardi (Eds.) *Ecologia das interações plantas-animais: uma abordagem ecológico-evolutiva*. pp. 37–50, Technical Books, Rio de Janeiro.
- DEL-CLARO, K., and P. S. OLIVEIRA. 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., V. RICO-GRAY, H. M. TOREZAN-SILINGARDI, E. ALVES-SILVA, R. FAGUNDES, D. LANGE, W. DÁTILLO, A. A. VILELA, A. AGUIRRE, and D. RODRIGUEZ-MORALES. 2016.

- Loss and gains in ant–plant interactions mediated by extrafloral nectar: fidelity, cheats, and lies. *Insectes Soc.* 63: 207–221.
- DEL-CLARO, K., D. RODRIGUEZ-MARALEZ, E. S. CALIXTO, A. S. MARTINS, and H. M. TOREZAN-SILINGARDI. 2019. Ant pollination of *Paepalanthus lundii* (Eriocaulaceae) in Brazilian savanna. *Ann. Bot.* 123: 1159–1165.
- DEL-CLARO, K., and H. M. TOREZAN-SILINGARDI. 2012. Ecologia das interações plantas-animais: uma abordagem ecológico-evolutiva K. Del-Claro and H. M. Torezan-Silingardi (Eds.). Composer, Uberlândia.
- DEL-CLARO, K., and H. M. TOREZAN-SILINGARDI. 2021. Plant-Animal Interactions K. Del-Claro and H. M. Torezan-Silingardi (Eds.). Springer International Publishing, Cham.
- FAGUNDES, R., W. DÁTILLO, S. P. RIBEIRO, V. RICO-GRAY, P. JORDANO, and K. DEL-CLARO. 2017. Differences among ant species in plant protection are related to production of extrafloral nectar and degree of leaf herbivory. *Biol. J. Linn. Soc.* 122: 71–83. Available at: <https://academic.oup.com/biolinnean/article/122/1/71/3869634>.
- FERREIRA, C. A., and H. M. TOREZAN-SILINGARDI. 2013. Implications of the floral herbivory on Malpighiaceae plant fitness: Visual aspect of the flower affects the attractiveness to pollinators. *Sociobiology* 60: 323–328.
- FOX, J., and S. WEISBERG. 2014. An R Companion to Applied Regression: Appendices. Robust Regres. R 1–17. Available at: <http://socserv.socsci.mcmaster.ca/jfox/Books/Companion/appendix.html>.
- FUTUYMA, D. 1992. Biologia evolutiva - Biogeografia. In D. J. Futuyma (Ed.) pp. 393–416, Sociedade Brasileira de Genética/CNPq, Ribeirão Preto.
- GONZÁLEZ-TEUBER, M., and M. HEIL. 2009. The role of extrafloral nectar amino acids for the preferences of facultative and obligate ant mutualists. *J. Chem. Ecol.* 35: 459–468.
- HOTHORN, T., F. BRETZ, and P. WESTFALL. 2008. Simultaneous inference in general parametric models. *Biometrical J.* 50: 346–363.
- JACOBSEN, D. J., and R. A. RAGUSO. 2018. Lingering Effects of Herbivory and Plant Defenses on Pollinators. *Curr. Biol.* 28: R1164–R1169. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.08.010>.
- JUNKER, R. R., C. C. DAEHLER, D. STEFAN, A. KELLER, and N. BLËTHGEN. 2011. Hawaiian ant-flower networks: Nectar-thieving ants prefer undefended native over introduced plants with floral defenses. *Ecol. Monogr.* 81: 295–311.
- KARBAN, R. 2011. The ecology and evolution of induced resistance against herbivores. *Funct. Ecol.* 25: 339–347.

- KESSLER, A., and A. CHAUTÁ. 2020. The ecological consequences of herbivore-induced plant responses on plant–pollinator interactions. *Emerg. Top. Life Sci.* 4: 33–43.
- KOPTUR, S. 1992. Extrafloral nectary-mediated interactions between insects and plants. *In* E. Bernays (Ed.) *Insect-Plant Interactions*. pp. 81–129, CRC Press, Boca raton.
- KORNDÖRFER, A. P., and K. DEL-CLARO. 2006. Ant defense versus induced defense in *Lafoensia pacari* (Lythraceae), a myrmecophilous tree of the Brazilian Cerrado. *Biotropica* 38: 786–788.
- LABANDEIRA, C. 2007. The origin of herbivory on land: Initial patterns of plant tissue consumption by arthropods. *Insect Sci.* 14: 259–275.
- LABANDEIRA, C. C. 1998. Early history of arthropod and vascular plant associations. *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* 26: 329–377.
- LANGE, D., E. S. CALIXTO, and K. DEL-CLARO. 2017. Variation in Extrafloral Nectary Productivity Influences the Ant Foraging R. M. Borges (Ed.). *PLoS One* 12: e0169492. Available at: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0169492>.
- LENTH, R. 2020. emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means. R Packag. version 1.3.0.
- LUCAS-BARBOSA, D. 2016. Integrating studies on plant-pollinator and plant-herbivore interactions. *Trends Plant Sci.* 21: 125–133. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2015.10.013>.
- MARQUIS, R. J. 2012. Uma abordagem geral das defesas das plantas contra a ação dos herbívoros. *In* K. Del-Claro and H. M. Torezan-Silingardi (Eds.) *Ecologia das interações plantas-animais: uma abordagem ecológico-evolutiva*. pp. 55–66, Rio de Janeiro: Technical Books.
- MARQUIS, R. J., and R. F. MOURA. 2021. Escape as a Mechanism of Plant Resistance Against Herbivores. *In* *Plant-Animal Interactions*. pp. 39–57, Springer.
- MELATI, B. G., and L. C. LEAL. 2018. Aggressive bodyguards are not always the best: Preferential interaction with more aggressive ant species reduces reproductive success of plant bearing extrafloral nectaries. *PLoS One* 13: e0199764.
- MOREIRA, X., B. CASTAGNEYROL, L. ABDALA-ROBERTS, and A. TRAVESET. 2019. A meta-analysis of herbivore effects on plant attractiveness to pollinators. *Ecology* 100: 1–8.
- MOTHERSHEAD, K., and R. J. MARQUIS. 2000. Fitness impacts of herbivory through indirect effects on plant-pollinator interactions in *Oenothera macrocarpa*. *Ecology* 81: 30–40.
- MOURA, R. F., E. COLBERG, E. ALVES-SILVA, I. MENDES-SILVA, R. FAGUNDES, V. STEFANI, and K. DEL-CLARO. 2021. Biotic defenses against herbivory. *In* *Plant-animal interactions*. pp.



- 93–118, Springer.
- NOVAES, L. R., E. S. CALIXTO, M. L. DE OLIVEIRA, L. ALVES-DE-LIMA, O. DE ALMEIDA, and H. M. TOREZAN-SILINGARDI. 2020. Environmental variables drive phenological events of anemocoric plants and enhance diaspore dispersal potential: A new wind-based approach. *Sci. Total Environ.* 730: 139039.
- OLIVEIRA, P. S., and A. V. L. L. FREITAS. 2004. Ant-plant-herbivore interactions in the neotropical cerrado savanna. *Naturwissenschaften* 91: 557–570.
- PACELHE, F. T., F. V. COSTA, F. S. NEVES, J. BRONSTEIN, and M. A. R. MELLO. 2019. Nectar quality affects ant aggressiveness and biotic defense provided to plants. *Biotropica* 51: 196–204.
- PEARSE, I. S., E. LOPRESTI, R. N. SCHAEFFER, W. C. WETZEL, K. A. MOONEY, J. G. ALI, P. J. ODE, M. D. EUBANKS, J. L. BRONSTEIN, and M. G. WEBER. 2020. Generalising indirect defence and resistance of plants. *Ecol. Lett.* 23: 1137–1152.
- POPA, V. I., I. M. GEORGESCU, C. D. POTOR, D. HOZA, and OTHERS. 2020. Defensive role of extrafloral nectaries. *Sci. Pap. B, Hortic.* 64: 693–700.
- QUIJANO-MEDINA, T., F. COVELO, X. MOREIRA, and L. ABDALA-ROBERTS. 2019. Compensation to simulated insect leaf herbivory in wild cotton (*Gossypium hirsutum*): responses to multiple levels of damage and associated traits. *Plant Biol.* 21: 805–812.
- R CORE TEAM. 2019. R: A language and environment for statistical computing. Available at: <https://www.r-project.org/>.
- RAUPP, P. P., R. V. GONÇALVES, E. S. CALIXTO, and D. V. ANJOS. 2020. Contrasting effects of herbivore damage type on extrafloral nectar production and ant attendance. *Acta Oecologica* 108.
- RICO-GRAY, V., and P. S. OLIVEIRA. 2007. The ecology and evolution of ant-plant interactions. The University of Chicago Press, Chicago.
- ROSUMEK, F. B., F. A. O. SILVEIRA, F. D. S. NEVES, N. P. NEWTON, L. DINIZ, Y. OKI, F. PEZZINI, G. W. FERNANDES, and T. CORNELISSEN. 2009. Ants on plants: a meta-analysis of the role of ants as plant biotic defenses. *Oecologia* 160: 537–549.
- RUSMAN, Q., E. H. POELMAN, F. NOWRIN, G. POLDER, and D. LUCAS-BARBOSA. 2019. Floral plasticity: Herbivore-species-specific-induced changes in flower traits with contrasting effects on pollinator visitation. *Plant Cell Environ.* 42: 1882–1896.
- SCHOONHOVEN, L. M., J. J. A. VAN LOON, and M. DICKE. 2005. *Insect-plant biology*. L. M. Schoonhoven, J. J. A. van Loon, and M. Dicke (Eds.). Oxford University Press, Oxford.
- TAGAWA, K. 2018. Repellence of nectar-thieving ants by a physical barrier: Adaptive role of

- petal hairs on *Menyanthes trifoliata*(Menyanthaceae). J. Asia. Pac. Entomol. 21: 1211–1214.
- TAIZ, L., and E. ZEIGER. 2009. Fisiologia vegetal. Porto Alegre, Artmed.
- THOMPSON, J. N. 1994. The coevolutionary process J. N. Thompson (Ed.). University of Chicago press, Chicago.
- THOMPSON, J. N. 2005. Coevolution: The Geographic Mosaic of Coevolutionary Arms Races. Curr. Biol. 15: 992–994.
- TRAGER, M. D., S. BHOTIKA, J. A. HOSTETLER, G. V ANDRADE, M. A. RODRIGUEZ-CABAL, C. S. MCKEON, C. W. OSENBURG, and B. M. BOLKER. 2010. Benefits for Plants in Ant-Plant Protective Mutualisms: A Meta-Analysis N. E. Raine (Ed.). PLoS One 5: e14308. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0014308>.
- VILELA, A. A., H. M. TOREZAN-SILINGARDI, and K. DEL-CLARO. 2014. Conditional outcomes in ant-plant-herbivore interactions influenced by sequential flowering. Flora Morphol. Distrib. Funct. Ecol. Plants 209: 359–366.
- VILLAMIL, N., K. BOEGE, and G. STONE. 2020. Ant guards influence the mating system of their plant hosts by altering pollinator behaviour. BioRxiv.
- VILLAMIL, N., K. BOEGE, and G. N. STONE. 2018. Ant-pollinator conflict results in pollinator deterrence but no nectar trade-offs. Front. Plant Sci. 9: 1–14. Available at: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2018.01093/full>.
- WHEELER, D. E. 1986. *Ectatomma tuberculatum*: Foraging biology and association with *Crematogaster*(Hymenoptera: Formicidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 79: 300–306.