

Universidade Federal de Uberlândia

Instituto de Biologia

**Programa de Pós Graduação em Ecologia e Conservação de Recursos
Naturais**

**Efeitos da assimetria floral e das
interações formigas-plantas nas
interações plantas-visitantes florais**

Gudryan Jackson Barônio

2017

Gudryan Jackson Barônio

**Efeitos da assimetria floral e das interações
formigas-plantas nas interações plantas-visitantes
florais**

Tese apresentada junto à Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais.

Orientador

Prof^a Dr. Kleber Del Claro

Uberlândia

Fevereiro – 2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

B266e Barônio, Gudryan Jackson, 1988-
2017 Efeitos da assimetria floral e das interações formigas-plantas nas
interações plantas-visitantes florais / Gudryan Jackson Barônio. - 2017.
85 f. : il.

Orientador: Kleber Del Claro.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais.
Inclui bibliografia.

1. Ecologia - Teses. 2. Cerrado - Teses. 3. Polinização - Teses. I. Del
Claro, Kleber. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-
Graduação em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais. III. Título.

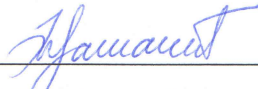
CDU: 574

Gudryan Jackson Barônio

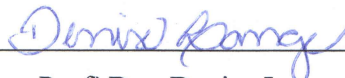
**Efeitos da assimetria floral e das interações formigas-plantas nas interações plantas-visitantes
florais**

Tese apresentada junto à Universidade Federal de Uberlândia,
como parte das exigências para obtenção do título de Doutor
em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais.

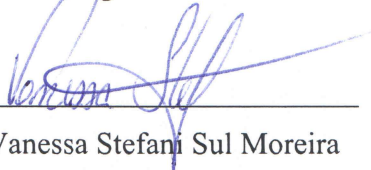
Aprovada em 22 de fevereiro de 2017



Profª Drª Marcela Yamamoto
Universidade Estadual de Goiás



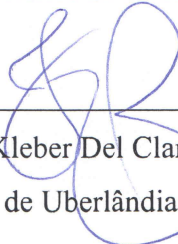
Profª Dra. Denise Lange
Universidade Tecnológica Federal do Paraná



Profª Drª Vanessa Stefani Sul Moreira
Universidade Federal de Uberlândia



Profª Drª Helena Maura Torezan-Silingardi
Universidade Federal de Uberlândia



Profª Dr. Kleber Del Claro
Universidade Federal de Uberlândia (Orientador)

Uberlândia
Fevereiro - 2017

Dedico todo o desdobramento deste trabalho à Maria.

*Uma avó incrivelmente maravilhosa que
lembro todos os dias desde a minha infância.*

Agradecimentos

Em primeiro e especial lugar gostaria de agradecer minha Mãe, pois sei que ela me quer bem e sempre me acompanhou de perto mesmo estando a quilômetros de distância.

Agradecimentos sinceros aos tutores do LECI, à Prof^a Maura, minha orientadora do mestrado e desde a primeira conversa me acolheu muito bem, e ao Prof^o Kleber, quem me recepcionou na UFU em 2011 e tem me dado muito apoio desde então.

Agradeço a ajuda dos professores, com grande importância: à Dra. Camila Aoki, à Dra. Vanessa Stefani, à Dra. Denise Lange, ao Dr. Estevão Alves Silva, ao Dr. André Rech, ao Dr. Vinícius Lourenço Garcia de Brito, pelas conversas informais, considerações e motivações sobre a vida acadêmica e principalmente pelas soluções de dúvidas científicas e não científicas que surgem durante o processo de se tornar doutor.

Inevitavelmente, durante o processo de formação reconheço a importância dos amigos: Renan Kobal, Vitao, Karen, Ceará, Bené, Japa, Helen, Marcela (RS), Ana Moneta, Luana Pfeffer, Lucas Issa, Renan Moura, Lino, Liégy, Teté, Claire, Bianca, Vanessa Stefani, Flávio Roque, Andrea Vilela, Alexandra Bächtold, Carla, Clébia, Diego Oliveira, Roberth Fagundes, Diego Anjos, Diogo Vilela, Eduardo Calixto, Fernando Valdivia, Everton Tizo, Felipe Amorim, e tantos outros que me ajudaram.

Reconheço também a participação e agradeço imensamente ao INBIO, nominalmente à Luiza, Helena e Péricles; ao Programa de Pós Graduação em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais, à Maria Angélica; e ao setor de transporte da UFU, pelas oportunidades de aprendizado, pelo apoio e por tudo que compartilhamos nos anos recentes.

Agradeço a participação do Clube de Caça e Pesca Itororó de Uberlândia, em especial aos funcionários da portaria, que permitiu a utilização da reserva de cerrado como área de estudo.

Agradeço também à CAPES, pela concessão da bolsa, que permitiu a realização do doutoramento.

Índice

Resumo-----	9
Introdução geral-----	10
Referências bibliográficas-----	15
CAPÍTULO 1-----	21
Abstract-----	23
Introduction-----	24
Material and methods-----	27
Study area-----	27
Plant species, ants and phenology-----	27
Spatial preferences of ants on plants-----	28
Effect of ant exclusion and ant presence on floral visitors-----	29
Temporal niche overlap-----	31
Effect of ant abundance on floral visitation and plant reproductive fitness-----	32
Results-----	34
Ant and plant phenological events-----	34
Spatial preferences of ants on plants-----	34
Effect of ant exclusion and ant presence on floral visitor behaviour and temporal niche overlap-----	34
Effect of ant abundance on floral visitation and plant reproductive fitness-----	35
Discussion-----	36
Acknowledgments-----	40
References-----	41
Figure legends-----	54
Figure 1-----	55
Figure 2-----	56
Figure 3-----	57

Figure 4-----	58
Supplementary Material 1. -----	59
Supplementary Material 2. -----	60
CAPÍTULO 2 -----	62
Resumo-----	64
Introdução -----	65
Material e métodos -----	66
Área e espécies estudadas -----	66
Simetria de característica reprodutivas e não reprodutivas -----	67
Simetria em flores visitadas e não visitadas -----	68
Recursos e simetria floral-----	69
Resultados -----	69
Simetria de características reprodutivas e não reprodutivas -----	69
Simetria em flores visitadas e não visitadas -----	70
Recursos e simetria floral-----	70
Discussão -----	70
Agradecimentos-----	73
Referências Bibliográficas -----	73
Figuras-----	79
Tabelas -----	81
Considerações finais -----	84

Resumo

Barônio, G.J. 2017. Efeitos da assimetria floral e das interações formigas-plantas nas interações plantas-visitantes florais. 85p.

Os recursos disponíveis durante a floração atraem diversos outros visitantes além dos polinizadores, como herbívoros e predadores. Além disso, a presença de nectários extraflorais atrai formigas que podem interferir no comportamento dos visitantes florais em relação à atratividade floral. Entretanto, a atratividade das flores também é resultado de como a morfologia atua sobre a capacidade cognitiva dos visitantes em função de reconhecer os caracteres florais e associá-los aos recursos disponíveis, onde a simetria floral é relacionada com a taxa de transferência de pólen e flores simétricas em geral tem maior produção de néctar, consequentemente são mais visitadas por polinizadores e exibem maiores taxas de frutificação. Nesse sentido, testamos hipóteses relacionadas à presença e abundância de formigas em função dos nectários extraflorais e seus efeitos sobre o comportamento dos visitantes florais e sobre a aptidão reprodutiva das plantas. Testamos ainda se a simetria floral (reprodutiva) está relacionada com a simetria foliar (vegetativa), com a quantidade e qualidade de recursos florais e com a preferência na escolha de flores para a visita, pois pressupomos uma forte seleção positiva da simetria floral devido à capacidade cognitiva associativa dos visitantes florais. Realizamos a coleta de dados entre março de 2013 e abril de 2014 em uma reserva de cerrado *sensu stricto* no sudeste brasileiro utilizando duas espécies de Malpighiaceae: *Banisteriopsis campestris* e *B. malifolia*, cujo principal recurso floral é óleo presente em glândulas na base das sépalas. Observamos sobreposição entre os períodos de brotação foliar e de maior abundância de formigas nas plantas. Com o maior número de nectários extraflorais perto das flores, houve maior abundância de formigas forrageando próximo as flores, afetando o comportamento dos visitantes. As visitas de abelhas de pequeno porte foram reduzidas, e consequentemente houve uma redução na sobreposição de nicho temporal entre os visitantes em *B. campestris*. Observamos ainda, efeitos variáveis sobre a frutificação e o tempo de visitas às flores quando manipulamos experimentalmente a densidade de formigas. Além disso, as duas espécies estudadas apresentaram maior ajuste entre caracteres reprodutivos do que entre caracteres vegetativos. Em *Banisteriopsis campestris*, a diferença na simetria entre flores visitadas e não visitadas foi diferente apenas nas medidas das pétala estandarte. Discutimos aqui as diferentes possibilidades, nas mesmas espécies de Malpighiaceae, determinadas às interações planta-polinizador tanto pela morfologia floral como pela interação formiga-planta. No entanto, não houve indicativo de relação entre a disponibilidade de recurso e a assimetria dos caracteres estudados.

Palavras-chave: Centridini, Cerrado, Ecologia cognitiva, Forrageamento, Polinização, Recursos florais.

Introdução geral

Nas interações mutualísticas existem diferentes graus de influência entre os organismos envolvidos, com relações que variam local e temporalmente (Thompson, 2005; Blüthgen & Klein, 2011). As espécies de uma rede de interações podem estar relacionadas através dos recursos produzidos e consumidos por elas, revelando a importância de interações onde há possibilidade de utilização de um mesmo recurso por várias espécies (Gianoli *et al.*, 2008). Essas relações deixam de ser vantajosas quando os custos de interação excedem os benefícios de manutenção da interação para todos os interagentes, especialmente quando existem diferentes graus de dependência entre eles (Bronstein *et al.*, 2006). Assim, os custos e benefícios podem alternar-se de acordo com a relação entre agentes de um mutualismo com outras espécies ou táxons interagentes, como os predadores (Bronstein, 1994; Ness, 2006). Em interações planta-polinizador, evolutivamente adaptadas pela disponibilidade de recursos florais (Janzen, 1975; Schöffler & Dötterl, 2011; Shenoy *et al.*, 2012), a influência de polinizadores está diretamente ligada ao sucesso reprodutivo e coexistência de plantas (Benadi *et al.*, 2013; Pauw, 2013).

A pesquisa sobre interações planta-polinizador é baseada em dois caminhos históricos segundo Mitchell *et al.* (Mitchell *et al.*, 2009a), (I) o estudo detalhado dos mecanismos florais juntamente com a história natural das relações planta-polinizador e (II) a abordagem de processos evolutivos, capazes de afetar a polinização e frutificação. As adaptações evolutivas entre polinizadores e plantas são estudadas a fim de compreender como duas ou mais populações associadas podem passar por mudanças evolutivas simultâneas, que pode lhes conferir um aumento em seu valor adaptativo (Janzen, 1974, 1980) e permite que haja manutenção e diversidade de espécies e de funções ecológicas (Thompson, 1988; Mitchell *et al.*, 2009b).

Estudos de história evolutiva nos revelam que geralmente os visitantes florais se adaptam em função dos recursos florais e o modo como eles são oferecidos (Janzen, 1975; Schöffler & Dötterl, 2011; Shenoy *et al.*, 2012). Além disso, o modo como os recursos são apresentados e disponibilizados influencia e modifica o comportamento dos polinizadores e de outros visitantes florais, tornado as visitas de polinizadores mais ou menos frequentes devido a diferenças na quantidade (Capellari *et al.*, 2011) e qualidade (Cappellari *et al.*, 2012) de recursos (e.g. pólen, néctar ou óleo) oferecidos ou no esforço para a obtenção deles (Lavery, 1994; Gumbert, 2000; Pellmyr, 2002).

Os visitantes florais são continuamente expostos à emissão dos sinais florais e durante esse processo pode haver associação e memorização da relação dos sinais com qualidade e quantidade de recursos florais (Raine & Chittka, 2007). Nesse sentido, um importante aspecto nas interações entre plantas e polinizadores é a cognição dos visitantes, designada como a capacidade de adquirir, processar, reter e posteriormente utilizar a informação captada através dos sentidos (Dukas, 2004; Dukas & Ratcliffe, 2009; Brito *et al.*, 2014). A morfologia floral, em especial a cor da flor, mantém evolutivamente a emissão de sinais florais com alta importância no processo cognitivo das interações entre plantas e polinizadores, ligados a especialização dessas interações e até a diversificação das angiospermas (Weiss, 1991; Lunau, 2004; Schiestl & Johnson, 2013). Portanto, as habilidades cognitivas dos polinizadores podem limitar suas preferências para algumas características, como cor, simetria, brilho ou qualquer outro caracter percebido (Chittka & Waser, 1997; Chittka & Thomson, 2001). Embora as abelhas respondam a diferentes estímulos (e.g. odor, cor, tamanho e formato das flores) (Free, 1970; Jersákova *et al.*, 2012), dentro de um universo de flores artificiais já testadas há preferência por flores com padrões menos repetitivos, mais circulares e com padrões simétricos (Lehrer *et al.*, 1995; Dafni *et al.*, 1997).

A simetria floral é um exemplo de sinalização floral, em alguns casos têm sido associada à transferência de pólen, à elevada frequência de interações com visitantes florais, ou ainda com a produção de néctar floral, que é maior em algumas flores simétricas (Møller, 1995; Møller *et al.*, 1995). Portanto, essa característica floral é usada como sinal cognitivo para melhorar o reconhecimento da flor e a presença de recursos. Além disso, alguns sinais podem ser úteis não somente para atrair abelhas, mas também ajudando-as a efetuarem visitas legítimas (Leonard *et al.*, 2013). Consequentemente, flores simétricas podem se tornar preditivas de qualidade e quantidade de recursos, e evolutivamente, a assimetria tende a não ser selecionada devido à menor aptidão reprodutiva apresentada por indivíduos mais assimétricos (Møller *et al.*, 1995; Møller & Swaddle, 1997; Hansen *et al.*, 2012; Jersáková *et al.*, 2012a).

A capacidade cognitiva dos visitantes florais define a preferência de algumas características, como cor, simetria, brilho ou qualquer outra característica que possa ser perceptível aos olhos da espécie visitante, desde que essa característica represente uma possibilidade de aumento na aptidão. Dessa forma, a cor das flores é um importante atributo na cognição dos visitantes florais e apesar de imperceptíveis aos olhos humanos, grande parte dos polinizadores tem a capacidade de distinguir melhor as cores, inclusive em comprimentos de onda da faixa do ultravioleta (Land & Nilson, 2002). Assim, dado que as interações planta-polinizador são multisensoriais e mediadas por recompensas, o uso dos modelos de cor combinados com a perspectiva experimental aumentam o entendimento das relações dos interagentes (Leonard & Papaj, 2011; Leonard *et al.*, 2013; Suzuki & Ohashi, 2014; Brito *et al.*, 2015). Por exemplo, os visitantes florais recebem os sinais referentes ao display floral e o assimilam através de um sistema sensorial quais e quantos recursos estão nas flores das quais receberam esse estímulo. Porém, para que essa assimilação seja possível, deve haver um aprendizado, que seria a associação cognitiva entre os displays floral e os seus respectivos recursos florais (Chittka & Thomson, 2001).

No entanto, a distribuição de recursos pode ser alterada de acordo com os resultados das interações que são mediadas não só pelas características morfológicas, mas também pelo comportamento de todos os visitantes (Biesmeijer *et al.*, 1999; Dworschak *et al.*, 2010). A distribuição dos recursos pode ser alterada de acordo com os resultados das interações, mutualísticas ou competitivas, que são mediadas pelas características morfológicas e comportamentais dos visitantes (Biesmeijer *et al.*, 1999; Dworschak *et al.*, 2010), no qual se deve considerar também a presença de pilhadores que competem pelo mesmo recurso (Almeida-Soares *et al.*, 2010). Por exemplo, a presença de pilhadores pode alterar a distribuição temporal e a frequência de visitas dos polinizadores, causando uma queda na quantidade de frutos e sementes formados (Torezan-Silingardi & Del-Claro, 1998; Genini *et al.*, 2010). No entanto, a presença de pilhadores também pode alterar o comportamento dos polinizadores e levar a maiores taxas de polinização cruzada, favorecendo a qualidade da semente formada (Almeida-Soares *et al.*, 2010).

As plantas não disponibilizam recursos apenas aos polinizadores, de forma que a distribuição de recursos pela presença de nectários extraflorais (NEFs) podem distrair ou saciar formigas, reduzindo indiretamente a utilização dos recursos florais ou permanência em flores consequentemente não alterariam padrões de visitação por polinizadores (Wagner and Kay 2002; Ness 2006). No entanto, a presença de formigas na planta pode caracterizar competição por espaço de forrageamento entre formigas e polinizadores e levar ainda a interações agonísticas (Brito *et al.*, 2012; Shenoy *et al.*, 2012; Gonzálvez *et al.*, 2013; Assunção *et al.*, 2014; Dáttilo *et al.*, 2016). Dessa forma, a interação formiga-planta representa uma pressão seletiva importante para as plantas que desenvolveram diferentes mecanismos de defesa contra herbívoros e mecanismos que aumentem a aptidão reprodutiva (Brito *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2012; Gonzálvez *et al.*, 2013; Assunção *et al.*, 2014; Dáttilo *et al.*, 2016). Por exemplo, a ausência de herbívoros em plantas mirmecófitas pode tornar os custos, da produção de néctar

extrafloral, superiores aos benefícios da proteção induzida pelas formigas mutualistas (Wagner and Kay 2002; Dáttilo *et al.* 2012). As formigas estão entre os mais importantes interagentes das plantas (Del-Claro *et al.*, 2016; Fagundes *et al.*, 2016; Lange *et al.*, 2017), especialmente quando há NEFs que disponibilizam recursos que reforçam a interação com as formigas (Holland *et al.*, 2010; Lange *et al.*, 2017). Portanto, em interações formiga-planta existem diferentes graus de influência para os outros organismos envolvidos que variam local e temporalmente (Vilela *et al.*, 2014; Dáttilo *et al.*, 2015, 2016). Os efeitos de formigas nas interações planta-polinizadores são intercambiáveis de acordo com as diferentes condições de morfologia da planta, especialmente de flores e o posicionamento dos NEFs na planta (Bronstein, 1994; Vilela *et al.*, 2014), agressividade da formiga (Ness, 2006; Gonzálvez *et al.*, 2013; Dáttilo *et al.*, 2016) e outras interagentes de plantas (por exemplo, visitantes florais, herbívoros, etc.) (Renault *et al.*, 2005).

Desse modo, a atividade das formigas pode ser controversa para as plantas, sendo negativa: consumindo ou inviabilizando pólen (Ness, 2006; Junker *et al.*, 2007) ou ainda tendo um impacto negativo na polinização por insetos, reduzindo a intensidade de visitas dos polinizadores, que são repelidos pela atividade agressiva ou simplesmente pela presença das formigas (Tsuji *et al.*, 2004; Junker *et al.*, 2007; Assunção *et al.*, 2014). No entanto, pode ser positiva, diminuindo a quantidade de herbívoros, aumentando a frutificação (Del-Claro & Oliveira, 2000; Blüthgen *et al.*, 2004), e aumentando a quantidade e qualidade das interações mutualísticas para as plantas (Holland *et al.*, 2011). Dentre os efeitos diretos da presença de formigas em flores: o odor das formigas é um bom indicador para abelhas, que transferem mais de pólen entre flores sem sinais de odor de formigas e removem menos pólen de flores com esses odores (Cembrowski *et al.*, 2014). Dessa forma, a presença de formigas altera a dinâmica da interação planta-polinizador de acordo com a agressividade de formigas, onde alguns visitantes florais são selecionados pela evasão de outros (Gonzálvez *et al.*, 2013).

Assim, com intuito de dar maior entendimento às interações planta-polinizador e entender mais sobre os efeitos das formigas sobre essas interações, apresento a seguir dois dos capítulos gerados durante a execução do projeto de doutorado. O primeiro capítulo, intitulado “Increase of ant density promotes dual effects on bee behaviour and plant reproductive fitness”, foi destinado a investigar os efeitos da presença de formigas sobre o comportamento dos visitantes, incluindo alterações sobreposição de nicho temporal, e sobre o sucesso reprodutivo das plantas. O segundo capítulo, intitulado “Simetria floral de Malpighiaceae como guia cognitivo para os visitantes florais: ligações com a disponibilidade de recursos e o ajuste com características vegetativas”, teve como objetivo verificar se a simetria floral está diretamente relacionada com a disponibilidade de recursos florais aos visitantes, servindo como uma indicativo visual de qualidade e/ou quantidade de recurso. Neste capítulo, verificou-se ainda uma possível integração entre caracteres morfológicos reprodutivos e vegetativos.

Referências bibliográficas

- Almeida-Soares, S., Polatto, L.P., Dutra, J.C.S. & Torezan-Silingardi, H.M. (2010) Pollination of *Adenocalymma bracteatum* (Bignoniaceae): floral biology and visitors. *Neotropical entomology*, **39**, 941–948.
- 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 (Jena)*, **209**, 244–249.
- Benadi, G., Blüthgen, N., Hovestadt, T. & Poethke, H.-J. (2013) When can plant-pollinator interactions promote plant diversity? *The American naturalist*, **182**, 131–46.
- Biesmeijer, J.C. & Richter, J.A.P. (1999) Niche differentiation in nectar-collecting stingless bees: the influence of morphology, oral choice and interference competition. *Ecological Entomology*, **24**, 380–388.
- Blüthgen, N. & Klein, A.-M.M. (2011) Functional complementarity and specialisation: The role of biodiversity in plant-pollinator interactions. *Basic and Applied Ecology*, **12**, 282–291.

- Blüthgen, N., Stork, N.E. & Fiedler, A.K. (2004) Bottom-up control and co-occurrence in complex communities: honeydew and nectar determine a rainforest ant mosaic. *Oikos*, **106**, 344–358.
- Brito, A.F.F., Presley, S.J.J. & Santos, G.M.M. (2012) Temporal and trophic niche overlap in a guild of flower-visiting ants in a seasonal semi-arid tropical environment. *Journal of Arid Environments*, **87**, 161–167.
- Brito, V., Telles, F. & Lunau, K. (2014) Ecologia cognitiva da polinização. In: *Biologia da Polinização*. pp. 417–438. ISBN: 978-85-68126-01-1
- Brito, V.L.G., Weynans, K., Sazima, M. & Lunau, K. (2015) Trees as huge flowers and flowers as oversized floral guides: the role of floral color change and retention of old flowers in *Tibouchina pulchra*. *Frontiers in Plant Science*, **6**: 362.
- Bronstein, J.L. (1994) Conditional outcomes in mutualistic interactions. *Trends in ecology & evolution (Personal edition)*, **9**, 214–217.
- Bronstein, J.L., Alarcón, R. & Geber, M. (2006) The evolution of plant-insect mutualisms. *The New phytologist*, **172**, 412–28.
- Capellari, S.C., Haleem, M. a, Marsaioli, A.J., Tidon, R. & Simpson, B.B. (2011) *Pterandra pyroidea*: a case of pollination shift within neotropical Malpighiaceae. *Annals of botany*, **107**, 1323–34.
- Capellari, S.C., Melo, G.A.R., Aguiar, A.J.C. & Neff, J.L. (2012) Floral oil collection by male *Tetrapedia* bees (Hymenoptera: Apidae: Tetrapedini). *Apidologie*, **43**, 39–50.
- Cembrowski, A.R., Tan, M.G., Thomson, J.D. & Frederickson, M.E. (2014) Ants and ant scent reduce bumblebee pollination of artificial flowers. *The American naturalist*, **183**, 133–9.
- Chittka, L. & Waser, N.M. (1997) Why red flowers are not invisible to bees. *Plant Science*, **45**, 169–183.
- Chittka & Thomson. (2001) *Cognitive Ecology of Pollination*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Dafni, A., Lehrer, M. & Kevan, P.G. (1997) Spatial flower parameters and insect spatial vision. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, **72**, S0006323196005002.
- Dáttilo, W., Aguirre, A., Flores-Flores, R.V., Fagundes, R., Lange, D., García-Chávez, J., *et al.* (2015) Secretory activity of extrafloral nectaries shaping multitrophic ant-plant-herbivore interactions in an arid environment. *Journal of Arid Environments*, **114**, 104–109.
- Dáttilo, W., Aguirre, A., la Torre, P.L. De, Kaminski, L.A., García-Chávez, J. & Rico-Gray, V. (2016) Trait-mediated indirect interactions of ant shape on the attack of caterpillars and

- fruits. *Biology letters*, **12**.
- Dáttilo, W., Martins, R.L., Uhde, V., Noronha, J.C., Florêncio, F.P. & Izzo, T.J. (2012) Floral resource partitioning by ants and bees in a jambolan *Syzygium jambolanum* (Myrtaceae) agroforestry system in Brazilian Meridional Amazon. *Agroforestry Systems*, **85**, 105–111.
- Del-Claro, K. & Oliveira, P.S. (2000) Conditional outcomes in a neotropical treehopper-ant association: temporal and species-specific variation in ant protection and hemipteran fecundity. *Oecologia*, **124**, 156–165.
- Del-Claro, K., Rico-Gray, V., Torezan-Silingardi, H.M., Alves-Silva, E., Fagundes, R., Lange, D., *et al.* (2016) Loss and gains in ant–plant interactions mediated by extrafloral nectar: fidelity, cheats, and lies. *Insectes Sociaux*, **63**, 207–221.
- Dukas, R. (2004) Evolutionary biology of animal cognition. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **35**, 347–374.
- Dukas, R. & Ratcliffe, J.M. (2009) *Cognitive Ecology II*. The University Of Chicago Press, Chicago.
- Dworschak, K. & Blüthgen, N. (2010) Networks and dominance hierarchies: Does interspecific aggression explain flower partitioning among stingless bees? *Ecological Entomology*, **35**, 216–225.
- Fagundes, R., Dáttilo, W., Ribeiro, S.P., Rico-Gray, V. & Del-Claro, K. (2016) Food source availability and interspecific dominance as structural mechanisms of ant-plant-hemipteran multitrophic networks. *Arthropod-Plant Interactions*, **10**, 207–220.
- Free, J. (1970) Effect of flower shapes and nectar guides on the behaviour of foraging honeybees. *Behaviour*, **37**, 269–285.
- Genini, J., Morellato, L.P.C., Guimarães, P.R. & Olesen, J.M. (2010) Cheaters in mutualism networks. *Biology letters*, **6**, 494–497.
- Gonzálvez, F.G., Santamaría, L., Corlett, R.T. & Rodríguez-Gironés, M. a. (2013) Flowers attract weaver ants that deter less effective pollinators. *Journal of Ecology*, **101**, 78–85.
- Gumbert, A. (2000) Color choices by bumble bees (*Bombus terrestris*) innate preferences and generalization after learning. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **48**, 36–43.
- Hansen, D.M., Niet, T. Van Der, Johnson, S.D. & Niet, V. Der. (2012) Floral signposts : testing the significance of visual “ nectar guides ” for pollinator behaviour and plant fitness. *Proceedings of The Royal Society of London B*, **279**, 634–639.
- Holland, J.N., Chamberlain, S.A. & Miller, T.E.X. (2011) Consequences of ants and extrafloral nectar for a pollinating seed-consuming mutualism: ant satiation, floral distraction or

- plant defense? *Oikos*, **120**, 381–388.
- 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.
- Silva CI da, Araújo G, de Oliveira PEAM (2012) Distribuição vertical dos sistemas de polinização bióticos em áreas de cerrado sentido restrito no Triângulo Mineiro, MG, Brasil Material e métodos. *Acta Botanica Brasilica*, **26**, 748–760.
- Janzen, D.H. (1974) The deflowering of Central America. *Natural History*, **83**, 49–53.
- Janzen, D.H. (1975) *The ecology of plants in the tropics*. Edward Arnold, Londres.
- Janzen, D.H. (1980) When is it coevolution? *Evolution*, **34**, 611–612.
- Jersákova, J., Jürgens, A., Smilauer, P. & Johnson, S.D. (2012) The evolution of flora mimicry: identifying traits that visually attract pollinators. *Functional Ecology*, **26**, 1381–1389.
- Junker, R., Chung, A.Y.C. & Blüthgen, N. (2006) Interaction between flowers, ants and pollinators: additional evidence for floral repellence against ants. *Ecological Research*, **22**, 665–670.
- Land, M. & Nilson, D. (2002) *Animal eyes*. Oxford University Press, Oxford.
- Lange, D., Calixto, E.S. & Del-Claro, K. (2017) Variation in extrafloral nectary productivity influences the ant foraging. *PloS One*, **12**, e0169492.
- Laverty, T.M. (1994) Bumble bee learning and flower morphology. *Animal Behaviour*, **47**, 531–545.
- Lehrer, M., Horridge, G.A., Zhang, S.W. & Gadagkar, R. (1995) Shape Vision in Bees: Innate Preference for Flower-Like Patterns. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*.
- Leonard, A.S., Brent, J., Papaj, D.R. & Dornhaus, A. (2013) Floral Nectar Guide Patterns Discourage Nectar Robbing by Bumble Bees. *PLoS One*, **8**, 1–6.
- Leonard, A.S. & Papaj, D.R. (2011) “X” marks the spot: The possible benefits of nectar guides to bees and plants. *Functional Ecology*, **25**, 1293–1301.
- Lunau, K. (2004) Adaptive radiation and coevolution - Pollination biology case studies. *Organisms Diversity and Evolution*, **4**, 207–224.
- Mitchell, R.J., Flanagan, R.J., Brown, B.J., Waser, N.M. & Karron, J.D. (2009a) New frontiers in competition for pollination. *Annals of botany*, **103**, 1403–1413.
- Mitchell, R.J., Irwin, R.E., Flanagan, R.J. & Karron, J.D. (2009b) Ecology and evolution of plant-pollinator interactions. *Annals of botany*, **103**, 1355–1363.

- Møller, A.P. (1995) Bumblebee preference for symmetrical flowers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**, 2288–2292.
- Møller, A.P. & Eriksson, M. (1995) Pollinator preference for symmetrical flowers and sexual selection in plants. *Oikos*, **73**, 15–22.
- Møller, A.P. & Swaddle, J.P. (1997) *Asymmetry, developmental stability and evolution*. Oxford University Press, Oxford.
- Ness, J.H. (2006) A mutualism's indirect costs: the most aggressive plant bodyguards also deter pollinators. *Oikos*, **113**, 506–514.
- Pauw, A. (2013) Can pollination niches facilitate plant coexistence? *Trends in ecology & evolution*, **28**, 30–7.
- Pellmyr, O. (2002) Pollination by animals. In: *Plant animal interactions: an evolutionary approach* (ed. by Herrera, C.M. & Pellmyr, O.). Blackwell, p. 313.
- Raine, N.E. & Chittka, L. (2007) The adaptive significance of sensory bias in a foraging context: floral colour preferences in the Bumblebee *Bombus terrestris*. *PloS One*, **2**, e556.
- Renault, C.K., Buffa, L.M. & Delfino, M. a. (2005) An aphid-ant interaction: effects on different trophic levels. *Ecological Research*, **20**, 71–74.
- Schäffler, I. & Dötterl, S. (2011) A day in the life of an oil bee: Phenology, nesting, and foraging behavior. *Apidologie*, **42**, 409–424.
- Schiestl, F.P. & Johnson, S.D. (2013) Pollinator-mediated evolution of floral signals. *Trends in Ecology & Evolution*, **28**, 307–315.
- Shenoy, M., Radhika, V., Satish, S. & Borges, R.M. (2012) Composition of extrafloral nectar influences interactions between the myrmecophyte *Humboldtia brunonis* and its ant associates. *Journal of Chemical Ecology*, **38**, 88–99.
- Suárez, L.H., Gonzáles, W.L. & Gianoli, E. (2009) Foliar damage modifies floral attractiveness to pollinators in *Alstroemeria exerens*. *Evolutionary Ecology*, **23**, 545–555.
- Suzuki, M.F. & Ohashi, K. (2014) How does a floral colour-changing species differ from its non-colour-changing congener? - a comparison of trait combinations and their effects on pollination. *Functional Ecology*, **28**, 549–560.
- Thompson, J.N. (1988) Coevolution and alternative hypothesis on insect-plant interactions. *Ecology*, **69**, 983–985.
- Thompson, J.N. (2005) *The geographic mosaic of coevolution*. University of Chicago Press, Chicago.
- Torezan-Silingardi, H.M. & Del-Claro, K. (1998) Behaviour of visitors and reproductive

- biology of *Campomanesia pubescens* (Myrtaceae) in Cerrado vegetation. *Ciencia Hoje*, **50**, 281–284.
- Tsuji, K., Hasyim, A., Nakamura, H. & Nakamura, K. (2004) Assian weaver ants, *Oecophylla smaradigma*, and their repelling of pollinators. *Ecological Research*, **19**, 669–673.
- Vilela, A.A., Torezan-Silingardi, H.M. & Claro, K. Del. (2014) Conditional outcoms in ant-plant-herbivore interactions influenced by sequential flowering. *Flora (Jena)*, **209**, 359–366.
- Wagner, D. & Kay, A. (2002) Do extrafloral nectaries distract ants from visiting owers? An experimental test of an overlooked hypothesis. *Evolutionary Ecology Research*, **4**, 293–305.
- Weiss, M. (1991) Floral colour changes as cues for pollinators. *Nature*, **354**, 227–229.

CAPÍTULO 1

Gudryan J. Barônio^{1*}

Kleber Del-Claro^{1,2}

Increase in ant density promotes dual effects on bee behaviour and plant reproductive fitness

¹ Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais, Universidade Federal de Uberlândia, Campus Umuarama, R: Ceará, S/N, Bloco 2D, CEP 38400-902 – Uberlândia – Minas Gerais – Brazil.

² Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia, Campus Umuarama, R: Ceará, S/N, Bloco 2D, CEP 38400-902 – Uberlândia – Minas Gerais – Brazil.

*Corresponding author: gudryan@gmail.com / +55 (34) 99170 7141

Abstract

Floral rewards do not only attract pollinators, but also herbivores and their predators. Ants are attracted by extrafloral nectaries (EFNs), situated near to flowers, and may interfere with the efficiency and behaviour of pollinators. We tested the hypothesis that the impacts of ant-pollinator interactions in plant-pollinator systems are dependent on: (i) the location of EFNs, which increase ant abundance closer to flowers; (ii) consequently, an ant effect, where ants decrease the temporal niche overlap of bees due to predator avoidance; (iii) ant density, where higher densities may negatively affect plant-pollinator interactions and plant fitness. We studied two ant-plant-bee systems based on *Banisteriopsis campestris* and *B. malifolia* plant species. The periods of high ant abundance coincided with plant species blooming. The presence of ants around flowers reduced the visitation rates of the smaller bees and the temporal niche overlap between bee species was not higher than randomly expected when ants had free access. Additionally, we observed variable ant effects on fruit set and duration of bee visits to both Malpighiaceae species when ant density was experimentally kept constant on branches, especially on *B. campestris*. Our goal was to show the dual role of ant density effects, especially because the different outcomes are not commonly observed in the same plant species. We believe that reduced temporal niche overlap between floral visitors due ant presence provides an opportunity for smaller bees to improve compatible pollination behaviour. Additionally, we concluded that floral visitor behaviour and reproductive plant fitness are dependent on ant density.

Key-words: Ant-plant mutualism, Bee foraging, Centridini, Niche overlap, Small bees.

Introduction

Plant attractiveness for pollinators is shaped by floral morphological features and resource rewards (Harder & Barrett, 2006; Peter & Johnson, 2008; Lunau *et al.*, 2009), which are offered to visitors in exchange for pollination services (Mitchell *et al.*, 2009b). Insect-plant interactions, especially those of bees and flowers, improve cross-pollination due to high pollen transfer by flower visitors, resulting in higher plant reproductive success and genetic variability (Harder & Barrett, 2006; Cosacov *et al.*, 2008; Rech *et al.*, 2014). Thus, it is expected that plant-pollinator interactions are directly influenced by the quality, quantity and temporal availability of floral resources (Janzen, 1975; Schäffler & Dötterl, 2011; Shenoy *et al.*, 2012). Some floral features help pollinators to associate the plant with resource availability, producing specific cognitive signals (Biesmeijer *et al.*, 1999; Dworschak *et al.*, 2010; Torezan-Silingardi, 2012).

Floral resources do not attract only effective pollinators but also a wide variety of floral visitors, including arthropods (Torezan-Silingardi, 2012; Wardhaugh, 2015). Flowering plants attract diverse arthropod fauna not only as a source of food for pollinators, but also as a refuge or reproductive site (Harder & Barrett, 2006; Ferreira & Torezan-Silingardi, 2013; Alves-Silva *et al.*, 2015; Alves-Silva & Del-Claro, 2016a). However, non-pollinator herbivores that negatively impact plants drive the development of defensive strategies in these organisms (Lanan & Bronstein, 2013; Vilela *et al.*, 2014). These defences can be physical, chemical, developmental, biotic, or a combination of distinct mechanisms (Crawley, 1983; Baker-Méio & Marquis, 2012). The most common biotic defence is provided by ants, in association with plants bearing extrafloral nectaries (Dáttilo *et al.*, 2015; Del-Claro *et al.*, 2016; Lange *et al.*, 2017). These glands are located outside of the flower and are not involved in pollination. They attract ants that feed on and benefit from them (Byk & Del-Claro, 2011), and in turn the ants provide protection to the plant, which can result in higher fruit set production (Del-Claro & Marquis, 2015; Stefani *et al.*, 2015).

The outcomes of ant activity on plants may vary from: (i) positive, decreasing the amount of herbivores, and increasing fruit set (Del-Claro & Oliveira, 2000; Blüthgen *et al.*, 2004), or the quantity and quality of mutualistic interactions for the plant (Holland *et al.*, 2011); to (ii) negative, with antagonistic effects, like consuming or destroying pollen (Ness, 2006; Junker *et al.*, 2007; Byk & Del Claro, 2010), reducing the frequency of bee visits due to ant presence and aggressiveness (Ness 2006; Junker et al. 2006; Assunção et al. 2014) and seed dispersers (Dáttilo *et al.*, 2016); or even (iii) showing no protective effects (Alves-Silva & Del-Claro, 2016a). Ant effects on plant-pollinator interactions may change according to the plant's traits such as phenology and morphology, particularly in terms of their floral structures and the location of their extrafloral nectaries (EFNs) (Bronstein, 1994; Vilela *et al.*, 2014). However, ant aggressiveness (Ness, 2006; González *et al.*, 2013), species identity (Del-Claro & Marquis, 2015) and the presence of other plant visitors (Renault *et al.*, 2005; Stefani *et al.*, 2015) also influence the outcomes of these interactions. For instance, when EFNs are distant from flowers or inflorescences, there is a reduction in the use of floral resources by ants and the ants remain further from the flowers, possibly increasing bee visitation due to lack of presence and aggressiveness of ants (Wagner & Kay, 2002; Assunção *et al.*, 2014). Although the presence of ants on flowering plants can alter plant-pollinator dynamics (Assunção *et al.*, 2014; Cembrowski *et al.*, 2014), ant density also affects flower selection by bees and may have an important role for plant fitness (e.g. seed set) same when in the presence of bumblebees (Galen & Geib, 2007; Assunção *et al.*, 2014). Although increased ant abundance interferes with plant reproduction by bumblebee pollination, the ant effects are variable and do not completely eliminate flower selection by bees (Galen & Geib, 2007).

A common example of these conflicting ant-plant-pollinator interactions is on the Malpighiaceae in the Brazilian savannah, the Cerrado. Several species of this family possess EFNs and are associated with a diverse ant fauna in a mutually beneficial relationship (Vilela

et al. 2014; Lange and Del-Claro 2014; Calixto et al. 2015). However, the EFNs are located nearby flowers, producing negative interactions between ants and pollinators (Assunção *et al.*, 2014). The Cerrado Malpighiaceae are common shrubs that are easy to manipulate due to their small size (1–2 m tall) and occur in open areas and vegetation borders (Ferreira & Torezan-Silingardi, 2013). In the neotropical region, almost all species of Malpighiaceae present oil glands at the base of the calyx (Vogel, 1974, 1990), which is a resource used by oil-collecting bees (Vogel, 1990; Alves-dos-Santos *et al.*, 2007), mainly Centridini, Tapinotaspidini and Tetrapediini (Alves-dos-Santos *et al.*, 2007; Ferreira & Torezan-Silingardi, 2013). However, the resource provided by Malpighiaceae flowers may vary temporally due to limited production (pollen) and activity time of oil glands (oil) (Mendes *et al.*, 2011; Boas *et al.*, 2013), which can generate temporal overlap between floral visitors. Temporal overlap occurs when food requirements and environmental constraints are similar among floral visitors (Polatto *et al.*, 2014; Vilela *et al.*, 2014).

Here, using two Cerrado Malpighiaceae species as a model, we tested the hypothesis that the impacts of ant-plant interactions on pollination systems are dependent on three main factors: (i) the location and seasonal activity of EFNs, which could promote a concentration of ants close to the reproductive parts of plants and affect the oil-collecting bees' visits; (ii) consequently, an ant effect, where ants decrease the temporal niche overlap of bees due to predator avoidance body size of bees, especially the small ones, such as the Tapinotaspidini, Tetrapediini and Meliponini tribes, which would be more affected due predation risk by ants; (iii) ant density, where a higher number of ants on plants may cause a negative additive effect on floral visitation and plant reproductive fitness.

Material and methods

Study area

We conducted fieldwork between March 2013 and April 2014 in the Cerrado *sensu stricto* (Gottsberger & Silberbauer-Gottsberger, 2006) of the Ecological Reserve of Clube de Caça e Pesca Itororó de Uberlândia (18°59'S and 48°18'W, WGS84 Datum, ~ 640 ha), Minas Gerais (MG) state, Brazil. The vegetation of the reserve is composed of several savannah phytophysionomies (Réu *et al.*, 2005). The mean monthly rainfall ranges between 0 and 360 mm, and the mean monthly temperature between 20.0°C and 25.5°C (Velasque and Del-Claro 2016).

Plant species, ants and phenology

We studied two Malpighiaceae species (see pictures in Supplementary Material 1): *Banisteriopsis campestris* (A. Juss.) Little, which has pink flowers of 2–3 cm in diameter and *B. malifolia* (Nees & Mart.) B. Gates, whose flower colour ranges from intense to pale pink, with flowers no greater than 2.5 cm in diameter. These species are widely distributed in Brazil (Mamede *et al.*, 2014) and have sequential flowering periods, with a short or medium duration and a spatial overlap during the blooming phase from December to March for *B. campestris* and March to May for *B. malifolia* (Vilela *et al.*, 2014). In both species, EFNs are active mainly in young leaves and inflorescences (Vilela *et al.* 2014; Assunção *et al.* 2014). The studied plant are foraged by different ant species belonging to the genera *Ectatomma*, *Cephalotes*, *Crematogaster* and *Camponotus* (Assunção *et al.*, 2014; Alves-Silva & Del-Claro, 2016a), which are the most common ants found in plants of the Brazilian savannah (Schoereder *et al.*, 2010; Lange & Del-Claro, 2014).

In order to verify whether there is a temporal overlap among sprouting events (young leaves – a proxy for EFNs), ant presence and flowering on Malpighiaceae plants, we made

monthly visual estimates of the intensity of young leaves and flowers in 30 individuals of each species, separated from each other by at least 15 metres, according to: 0 = missing event, 1 = event with low intensity (flowers present on 1–25% of the branches), 2 = event with medium low intensity (26–50% of the branches), 3 = event with medium high intensity (51–75% of the branches) and 4 = high intensity event (76–100%) (Fournier, 1974; Vilela *et al.*, 2014). We also quantified ant abundance by counting the number of ants on each of the studied plants. In order to make the data more clearly observed in circular graphs, we standardised and interpolated ant abundance to produce an index between 0 and 4, where maximum ant abundance observation was equal to 4 (Zar, 2010).

Monthly phenological events were analysed using circular statistics. The Watson test and the Rayleigh test were used to determine whether the data followed the statistical premise of a von Misses distribution and whether they were uniformly distributed over time, respectively. To verify the significance of the temporal gap between phenophases, we used a Watson-Wheeler test (Zar, 2010). When these tests produced a *p*-value less than 0.05, we inferred that the phenological events differed and were seasonally determined in accordance with the *r* value (concentration around the mean). The analysis was performed in the *circular* R package using R software version 3.3.1 (Agostinelli & Lund, 2013; TeamCore-R, 2015).

Spatial preferences of ants on plants

In order to study the daily spatial preference of ants on *B. malifolia* and *B. campestris*, we performed two simple tests. First, we counted the number of ants on 30 plants of each species and classified them as occurring either on branches or inflorescences. The 30 adult plants with similar size were randomly selected from each other by a minimum distance of 15 metres, and were not the same used for the phenological observations. We defined ‘branch’ as the part of the bough that contained only vegetative structures; the inflorescence was defined as the part

of the bough where there were flowers, floral buds or young leaves. For the second test, we used the same plants and maintained only one ant and excluding manually other ones on a random bough. We observed this unique ant for 10 minutes on each plant and recorded the percentage time spent by the ant on plant branches and inflorescences. During this experiment, it was not possible to record data blind because our study involved focal animals in the field. We conducted all ant observations in plants foraged only by *Camponotus* spp. (the most common ant genus in EFN-bearing plants in the Cerrado, Alves-Silva *et al.*, 2013, 2013b; Lange *et al.*, 2013; Lange & Del-Claro, 2014) during the blooming of species between 7:00h and 12:00h in the morning. During this period, ants are more active and the plant resources (extrafloral nectaries) are more readily available (Assunção *et al.*, 2014). These two observations allowed us to infer the abundance and preference of ants for these two plant parts. We confirmed the normality of the data by graphical inspection and used the *stats* package in R software (TeamCore-R, 2015) to perform a paired t-test per plant, using percentage time spent on each resource and ant abundance as response variables to test the statistical significance of differences between branches and inflorescences.

Effect of ant exclusion and ant presence on floral visitors

To investigate the effect of ants on plant-pollinator interactions, floral visitor observations were performed under two treatments: presence and absence of ants. For each treatment, 30 plants of each species were used, and ant absence was achieved by applying a non-toxic wax layer of TangleFoot® (Grand Rapids, MI, USA) around the base of the plant stems near the soil (e.g. Alves-Silva *et al.* 2014). For the ant presence treatment, we applied a small amount of wax to the plant stem in order to control for the effect of the wax, but in a way to allow the ant to get to the plant. Although we did observe ants from different genera on Malpighiaceae species in the study area and their aggressiveness is variable (Alves-Silva *et al.* 2014; Del-Claro and

Marquis 2015), we decided to study plants attended exclusively by ants from the *Camponotus* genus during our experiment, because the abundance of plants that contained other ant species was relatively low when compared with the *Camponotus* occupied ones. We identified ants to genus level because the two ant species present, *C. blandus* and *C. crassus*, are very similar in size, morphology, behaviour and aggressiveness. These ants are high common and effective in ant-plant protection mutualisms in the Cerrado (Brito *et al.*, 2012; Alves-Silva *et al.*, 2013, 2013a, 2013b; Nogueira *et al.*, 2015). Other ant genera were manually excluded from the plants every three days during field observations.

We assessed the floral visitors of *B. campestris* and *B. malifolia* using the all-occurrence sampling method (Altmann, 1974) after the second week of flowering (one observer: GJB), and we did not record data blind because our study involved focal animals in the field. Each observation session consisted of 25 min of observation and 5 min intervals from 07:00h to 18:00h, with 22 sessions per day for 20 days of flowering. We used a new plant for each observation period, totalling ~ 184 h of observation per species. During the floral visits we captured all bees, recorded the duration of the visit and made notes about the bees' resource collection behaviour. We classified large and small visitors according to oil-collecting tribes; Centridini were determined as large visitors and Tapinotaspidini, Tetrapediini and Meliponini as small visitors.

In order to investigate how the number of visits was affected by ant presence and bee size, we performed a general linear mixed model (GLMM) for each Malpighiaceae species using a Poisson distribution, as the data were counts and were not normally distributed (graphically observed). We defined large bees as Centridini and small bees as Tapinotaspidini and Tetrapediini. We used the number of visits as the response variable, the ant treatment and the categorised bee size as fixed factors, and the time classes of visits (11 hours per day day, from 07:00h to 18:00h) as a random factor (Zuur *et al.*, 2009; Bates *et al.*, 2015). The model was

fitted using the *lme4* package (Bates *et al.*, 2015) in R software (TeamCore-R, 2015). The significance of the model was tested by computing the analysis of deviance table of the performed model and its respective null model, where the predictor variables were not included (Crawley, 2012).

Temporal niche overlap

To evaluate the temporal niche overlap of floral visitors to both plant species, we calculated the Pianka overlap index (Pianka, 1973) for each pair in each ant treatment. Values of the Pianka index close to zero imply the use of exclusive resource categories (niche segregation), whereas values close to 1 report similar resource utilisation (niche overlap). The mean overlap was calculated using all possible pairs of species in the matrix of species (rows) and hours of the day (according to observation sessions), which represented the temporal niche (columns). To assess the significance of the temporal niche overlap means, each species matrix was randomised ($n = 10,000$) according to the algorithm ROSARIO (Castro-Arellano *et al.*, 2010) to create a null distribution of overlaps. According to the ROSARIO model, there is a randomisation of entire distributions within the time frame of analysis, which better preserves the temporal autocorrelation inherent in activity patterns, in contrast to other simulation approaches. The two-tailed significance was determined by comparing the values with their respective empirical distribution ($\alpha = 0.05$). Temporal coincidence is indicated by an observed overlap that is significantly greater than that expected by chance. Temporal segregation is indicated by a significantly lower value than that expected by chance (Albrecht & Gotelli, 2001). The randomisations and significance of the ROSARIO model were conducted using the software TimeOverlap. In each randomisation of ROSARIO, the entire activity patterns of species are advanced in sequence and the alternative distributions represent the same activity at a new location in the time frame. This model is specific to temporal analysis because the

autocorrelation is maintained according to the circular distribution of activity patterns and it is more realistic biologically (Castro-Arellano *et al.*, 2010).

In order to deduce how temporal niche overlap was affected by ant treatment, we performed a GLMM using all pairs of overlap values as the response variable and the ant treatment as the fixed factor. Due to different hours of bee observations during the day (11 hours per day, from 07:00 h until 18:00 h), the range of hours was included as a random factor (Zuur *et al.*, 2009; Bates *et al.*, 2015). The pairwise overlap values are percentage values, and as they did not fulfil the assumption of normality, we rounded and rescaled the values on a range from zero to the maximum observed value. Thus, we used a Poisson distribution and the model was fitted using the *lme4* package (Bates *et al.*, 2015) in R software (TeamCore-R, 2015). The significance of the model was tested by computing the deviance analysis table (*anova* function) of the performed model and its respective null model, where predictor variables were not included (Crawley, 2012).

Effect of ant abundance on floral visitation and plant reproductive fitness

We conducted two tests to investigate the effects of ant abundance on plant reproductive fitness. Firstly, we conducted an observational step to verify the effect of ant abundance on floral visitation rates. We observed 30 plants at three different times of day (09:00 h, 11:00 h and 15:00 h) for 20 minutes. During this time, we counted (i) the number of ants of all species on each plant, (ii) the number of bee visits to flowers, (iii) the number of active EFNs on inflorescence, and (iv) the total number of opened flowers. To verify whether there was an effect of ant abundance on floral visitation rates by oil-collecting bees, we performed a GLMM using the mean number of bee visits to flowers as the response variable and the number of ants on the plant as the predictor variable. In this model, we also included the number of active EFNs (*sensu* Calixto *et al.*, 2015) and opened flowers as random variables.

Secondly, in an experimental step, we controlled the ant *Camponotus* spp. density on plants in order to investigate how different densities can affect the plant-pollinator interaction and the plant's reproductive fitness. We performed four treatments with 0 (control treatment), 5, 10 and 30 ants per branch on all branches of plants, and used 10 plants per Malpighiaceae species ($n = 80$). We selected plants with ant abundance close to that required for each density treatment and then included or excluded ants using a thin entomological clamp when necessary. Ants were kept on the branches by applying a wax layer of TangleFoot® (Grand Rapids, MI, USA) at approximately 50 cm from the top of the branch (considering a mean branch length of 60 cm). In order to keep a constant ant density on plants in each treatment, all of them were monitored twice per day during the floral visitor data collection period (5 days per species) and once per day between the end of bee visitation (flower fall) and the beginning of fruit formation. During this experiment, we recorded (i) the number of bee visits received at three different times of day (09:00 h, 11:00 h and 15:00 h) for 20 minutes, (ii) the duration of the first floral visit by each floral visitor, and (iii) the fruit set, which was the total number of fruits produced divided by the total number of flowers produced at the end of the reproductive season. In order to analyse the effect of the controlled ant density (predictor variable) on floral visitation, duration of visit, fruit set and (response variables), we performed three GLMM analyses including on them the total number of produced flowers as a random variable. As our data were counts, we used the Poisson distribution to normalise the residuals of all models (for the first and second experimental steps). All models were fitted using the *lme4* package (Bates *et al.*, 2015) in R software (TeamCore-R, 2015). The significance of all models was tested by computing the analysis of deviance (*anova* function) as described above (Crawley, 2012).

Results

Ant and plant phenological events

The Malpighiaceae leaves sprouted from October to December and flowered from December to March (*B. campestris*) and from February to May (*B. malifolia*). The presence of ants on plants was verified in 10 months for *B. malifolia* and only in two for *B. campestris*, although we observed ants during other months (October, November, February and March) on unmonitored *B. campestris* plants (Fig. 1). The flowering of these species overlaps with periods of high ant abundance in April to June for *B. malifolia* and in January for *B. campestris* (Table 1). For both species, sprouting and ants only overlapped for a short time just before flowering (Fig. 1).

Spatial preferences of ants on plants

Ant abundance on *B. malifolia* plants was 3.83 ± 0.66 (results are presented in the form mean \pm standard error) individuals on branches and 5.9 ± 0.94 on inflorescences. The mean number of ants on *B. campestris* was around six (5.63 ± 1.07) and seven (6.96 ± 0.93) on branches and inflorescences, respectively. Ant abundance was similar on branches and inflorescences for both Malpighiaceae species (*B. malifolia*: Paired-T = 1.81; df = 29; $p = 0.081$; *B. campestris*: Paired-T = 1.13; df = 29; $p = 0.269$). However, for both plant species ants spent more time on inflorescences than on branches, which was 22.63% in *B. malifolia* (Paired-T = 3.74; df = 29; $p = 0.0008$) and 47.68% in *B. campestris* (Paired-T = 9.08; df = 29; $p < 0.0001$).

Effect of ant exclusion and ant presence on floral visitor behaviour and temporal niche overlap

The floral visitation rate varied according to an interaction between ant presence and bee tribe (a proxy for size) (Fig. 2) both in *B. campestris* ($\chi^2 = 27.918$; df = 3; $p < 0.0001$) and *B.*

malifolia ($\chi^2 = 25.293$; $df = 3$; $p < 0.0001$). On *B. malifolia* we registered a total of 58 Centridini and 37 non-Centridini bee visits under the ant presence treatment, and 56 Centridini and 112 non-Centridini visits under the ant absence treatment. For *B. campestris*, the ant presence treatment resulted in 80 Centridini and 63 non-Centridini visits, and 75 and 110 visits of the two tribes, respectively, under the ant absence treatment. This shows that non-Centridini bees visited flowers more frequently when ants were excluded than when they were present (Fig. 2). When we compared the bee visitor richness between plant treatments with and without ants, we observed exactly the same species in both treatments on *B. campestris* (Supplementary Material 2). However, for *B. malifolia*, only 77% of the number of bee species observed on ant-excluded plants were recorded when ants were present (Supplementary Material 2).

According to the niche overlap analysis based on null models, there was a higher mean temporal niche overlap than that expected by chance for *B. malifolia* plants, independent of treatment, and the same was observed in ant-excluded *B. campestris* shrubs (Table 2). On *B. malifolia*, there was no effect of ant treatment on bee temporal niche overlap, where $34.4 \pm 2.1\%$ of the temporal gap of Malpighiaceae resources overlapped in the ant presence treatment and $35.3 \pm 1.6\%$ in ant absence ($\chi^2 = 1.595$; $df = 1$; $p = 0.207$). On *B. campestris*, the overlap means were $31.8 \pm 2.1\%$ for ant presence and $37.05 \pm 1.8\%$ for ant absence, and the difference between treatments ($\chi^2 = 70.123$; $df = 1$; $p < 0.0001$) showed a reducing effect of ants on the temporal niche overlap (Table 3).

Effect of ant abundance on floral visitation and plant reproductive fitness

We observed that natural ant abundance had a negative effect on floral visitation (Fig. 3) in *B. campestris* ($\chi^2 = 11.886$; $df = 1$; $p = 0.0005$; $R^2 = 0.264$) but no ant abundance effect was observed on floral visitation in *B. malifolia* ($\chi^2 = 0.506$; $df = 1$; $p = 0.476$; $R^2 = 0.011$). Furthermore, when we experimentally altered ant densities, we observed that an increased in

ant density had a negative impact on floral visitation both on *B. malifolia* ($\chi^2 = 120.18$; $df = 3$; $p < 0.0001$) and *B. campestris* ($\chi^2 = 52.91$; $df = 3$; $p < 0.0001$). The ant density increase resulted in a decrease in oil-collecting bee visits between the treatments of 10 to 30 ants per branch in *B. malifolia* and from 5 to 30 ants per branch in *B. campestris* (see all effects in Table 4). The duration of visits was constant and not influenced by ants in *B. malifolia* ($\chi^2 = 2.49$; $df = 3$; $p = 0.477$) but was negatively impacted in *B. campestris* ($\chi^2 = 11.71$; $df = 3$; $p = 0.008$) (Fig. 4; Table 4). The fruit set was reduced (Table 4) when flowers were submitted to the higher ant densities treatments in *B. malifolia* ($\chi^2 = 9.76$; $df = 3$; $p = 0.021$). In *B. campestris* there was an opposite effect of ant density on fruit set ($\chi^2 = 140.43$; $df = 3$; $p < 0.0001$), where the total fruit set increased in the higher ant densities, however, there was a strong decrease in fruit set when plants were submitted to highest density of 30 ants per branch (Fig. 4).

Discussion

Our hypothesis that the impact of ant-plant interactions on pollination systems are dependent on the spatial localisation and seasonal activity of EFNs was corroborated. The leaf-sprouting period of *B. campestris* and *B. malifolia* occurred before flowering and promoted the emergence of extrafloral nectaries that were located on the base of leaves. Furthermore, we observed that ants spent more time near the reproductive structures of branches during the flowering season of plants, a period when there are active EFNs. During the leaf-sprouting period the EFNs become more active in Cerrado plants, even after flowering (Vilela *et al.*, 2014; Calixto *et al.*, 2015; Del-Claro & Marquis, 2015) and consequently they become more attractive to ants due to higher nectar availability (Wagner & Kay, 2002; Lange *et al.*, 2013, 2017). Indeed, there was an overlap between the periods of higher ant abundance and the flowering of the plants. We also found that when ants were present around flowers, the visitation rate of smaller bees was reduced and the temporal niche overlap was not higher than randomly

expected when ants had free access to *B. campestris*, confirming our second hypothesis. Furthermore, our third hypothesis was confirmed when we observed variable ant effects on fruit set and duration of visits to both Malpighiaceae species when ant density was experimentally kept constant on branches, especially in *B. campestris*.

Ants increase their probability of finding prey when they forage around flowers (Alves-Silva *et al.*, 2013c; González *et al.*, 2013; Del-Claro *et al.*, 2016). Ants may also visit inflorescences to find other resources, such as exudates offered by lepidopteran larvae (Kaminski & Freitas, 2010; Alves-Silva *et al.*, 2013) or hemipteran honeydew (Vilela *et al.*, 2014). Malpighiaceae pollination is a competitive system that naturally shows higher overlap between visitor species than expected by chance (Barônio & Torezan-Silingardi, 2016). However, smaller bees are more careful when approaching flowers with ant presence (Assunção *et al.*, 2014; Cembrowski *et al.*, 2014) and eventually reduce their visitation rate due to the increased risk of predation by ants (González *et al.*, 2013; Assunção *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014). Regardless of the fact that large bees were not affected by ant presence, they may recognise ant presence around the flowers and others may even identify ant scent, preventing ant attack (Assunção *et al.*, 2014; Cembrowski *et al.*, 2014). Centridini bees are able to visit more flowers per plant by spending less time at each flower they visit (Barônio & Torezan-Silingardi, 2016). Thus, these larger bees may optimise their visits throughout the temporal availability of resources when smaller bees are inhibited, as observed here. Centridini were the more abundant visitors to *B. malifolia*. The relationship between Malpighiaceae and Centridini is highly specialised (Vogel, 1990; Alves-dos-Santos *et al.*, 2007; Mello *et al.*, 2013). Therefore, it is possible that the high harvesting efficiency of Centridini has been evolutionarily selected to maintain pollination services (Mitchell *et al.*, 2009b). There are possible direct impacts of ant foraging close to flowers on pollination, where a specialised Centridini bee could potentially increase self-pollination due to increased visits amongst flowers of the same plant

(Sigrist & Sazima, 2004; Karron *et al.*, 2009). Accordingly, we consider that interactions between plants and floral visitors can be affected by a dual role of ants, for example: ants reduce floral visitors, which is a negative effect due to the removal of pollinators, but may also be a positive effect, due to the reduction of non-efficient floral visitors, which allows a decrease in the temporal niche overlap of effective pollinators.

Ant activity may exclude less effective pollinators due to predation avoidance (González *et al.*, 2013). However, as temporal niche overlap was not higher than randomly expected, it is important to clarify that ant presence did not totally exclude small floral visitors, and the composition of visitors was highly similar between ant presence and absence treatments. We observed that ants inhibited some visits or visitor species by predation avoidance, which has also been shown in other studies (González *et al.*, 2013; Assunção *et al.*, 2014; Dáttilo *et al.*, 2016). It is believed that the inhibition of these visits allows variation in the temporal availability of resources and consequently reduces temporal overlap among floral visitors (Santos *et al.*, 2013). We observed that there was higher overlap than expected by chance on *B. malifolia* same when ants were present and we hypothesised that this occurs due to the presence of a higher abundance of larger bee species as visitors. Larger bees are described as good perceivers of ant activity on flowers (Galen & Geib, 2007; Assunção *et al.*, 2014; Cembrowski *et al.*, 2014) and they were the major floral visitors to *B. malifolia* flowers in this study. It is possible that larger bees are able to exploit the temporal availability left by smaller bees due to ants inhibiting their visits to *B. malifolia*, as well as prevent an ant effect on visitation.

In this study, *B. campestris* had a higher richness of smaller bee species when compared with *B. malifolia*. These bees are known as robbers and do not show typical pollination behaviour on these Malpighiaceae flowers (Sigrist & Sazima, 2004; Cappellari *et al.*, 2012; Barônio & Torezan-Silingardi, 2016). Nonetheless, Vogel (Vogel, 1974, 1990) discussed that small bees are able to pollinate if they exhibit adequate pollen transfer during visits to

Malpighiaceae flowers. In comparison to *B. malifolia*, the reduced size of *B. campestris* flowers and its increased availability of time for bee visits implies that pollination of Malpighiaceae by small bees may be possible. Therefore, we believe that the lower temporal competition between bees caused by ants, especially in *B. campestris*, can increase the available time for smaller bees to visit, improving the compatibility of smaller bees' pollination behaviour with Malpighiaceae species.

According to previous studies, foraging ants promote a double role for Malpighiaceae species: (i) ants can be a good protection against herbivores once they patrol a plant when feeding from extrafloral nectaries (Lange & Del-Claro, 2014; Dáttilo *et al.*, 2015; Del-Claro *et al.*, 2016) and (ii) ants can be a selective factor for floral visitors (Junker & Blüthgen, 2010; González *et al.*, 2013), where only the larger bees maintain visitation rates because the smaller ones are at risk of ant predation (Junker *et al.*, 2007; Assunção *et al.*, 2014; Dáttilo *et al.*, 2016). Interestingly, in *B. campestris* there was an increase in fruit set and duration of visits when ant density was intermediate (10 ants per branch), even though there was a decrease in *B. campestris* bee visits due to ant density (Table 4; Fig. 4). Here, ants had variable effects on floral visitors according to density. Firstly, ants caused less bee competition for flowers by inhibiting some bee visits, which also reduced the temporal overlap among visitors. We hypothesise that this temporal niche overlap decrease releases time which may allow appropriate pollinator behaviour of smaller bees due to an extension of visits under intermediate ant densities and consequently an increase in fruit set (*B. campestris* – Fig. 4). Secondly, under higher ant density, there was a strong and negative effect on the number of floral visits (Wagner & Kay, 2002; Assunção *et al.*, 2014). Thus, when Malpighiaceae species were under the highest ant density they experienced reduced visitation and low fruit set, showing that pollination services can be influenced by ants (González *et al.*, 2013), even when the highly specialised bees are responsible for the major visits. Therefore, it seems plausible to suggest that

intermediate ant densities are better for plant reproductive fitness because they do not entirely exclude larger bees, which would prevent the major pollination service, and also allow smaller bees to perform appropriate pollination behaviour by not excluding these bees completely.

In this study, it was established that ant presence and spatial preferences on plants are stimulated by EFNs, mainly during flowering (first hypothesis). Additionally, ants prefer to spend more time around flowers than on branches without flowers, which affects bee visitation, especially of small bee species. We showed that ant presence not only caused a direct effect on visitation avoidance in smaller bees, but also had an indirect effect by reducing the temporal niche overlap (second hypothesis) when the bees were the main floral visitors (such as in *B. campestris*). Less competition among bees may provide an opportunity for smaller bees to improve compatible pollination behaviour. It was also concluded that ants may have different effects depending on their density (third hypothesis) regarding bee behaviour and plant reproductive fitness. Our study reveals an important double role of ants in interactions between Malpighiaceae and oil-collecting bees, and these roles are variable and density dependent.

Acknowledgments

The authors are grateful to Clube de Caça e Pesca Itororó de Uberlândia (CCPIU) for making the ecological reserve available and for the receptivity of the staff. The authors are also grateful to Dr. Helena Maura Torezan-Silingardi, Dr. Vanessa Stefani and Dr. Vinícius Lourenço Garcia Brito from Universidade Federal de Uberlândia (UFU), to Dr. Denise Lange, from Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), to Dr. Marcela Yamamoto from Universidade Estadual de Goiás (UEG) and to Dr. Wesley Dáttilo from Instituto de Ecología (INECOL) for useful corrections and suggestions to the manuscript, and to Victor Aguiar de Souza Penha for his corrections and suggestions during the English review. GJB is also grateful to the Brazilian funding agency Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

(CAPES) for the PhD scholarship granted from April 2013 to March 2017. KDC is thankful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support.

References

- Agostinelli, C. & Lund, U. (2013) R package “*circular*”: Circular Statistics (version 0.4-7).
- Albrecht, M. & Gotelli, N.J.J. (2001) Spatial and temporal niche partitioning in grassland ants. *Oecologia*, **126**, 134–141.
- Altmann, J. (1974) Observational Study of Behavior: Sampling Methods. *Behaviour*, **49**, 227–266.
- Alves-dos-Santos, I., Machado, I.C. & Gaglianone, M.C. (2007) História natural de abelhas coletoras de óleo. *Oecologia Brasiliensis*, **11**, 554–557.
- Alves-Silva, E., Bachtold, A., Barônio, G.J. & Del-Claro, K. (2013a) Influence of *Camponotus blandus* (Formicinae) and flower buds on the occurrence of *Parrhasius polibetes* (Lepidoptera: Lycaenidae) in *Banisteriopsis malifolia* (Malpighiaceae). *Sociobiology*, **60**, 30–34.
- Alves-Silva, E., Barônio, G.J., Torezan-Silingardi, H.M. & Del-Claro, K. (2013b) Foraging behavior of *Brachygastra lecheguana* (Hymenoptera: Vespidae) on *Banisteriopsis malifolia* (Malpighiaceae): Extrafloral nectar consumption and herbivore predation in a tending ant system. *Entomological Science*, **16**, 162–169.
- Alves-Silva, E., Del-Claro, K. & Claro, K. Del. (2013c) Effect of post-fire resprouting on leaf fluctuating asymmetry, extrafloral nectar, and ant-plant-herbivore interactions. *Naturwissenschaften*, **100**, 525–532.
- Alves-Silva, E., Bächtold, A., Barônio, G.J., Torezan-Silingardi, H.M. & Del-Claro, K. (2015) Ant-herbivore interactions in an extrafloral nectaried plant: are ants good plant guards against curculionid beetles? *Journal of Natural History*, **49**, 841–851.

- Alves-Silva, E. & Del-Claro, K. (2015) On the inability of ants to protect their plant partners and the effect of herbivores on different stages of plant reproduction. *Austral Ecology*, **41**, 263-272.
- 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: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, **209**, 244–249.
- Baker-Méio, B. & Marquis, R.J. (2012) Context-dependent benefits from ant-plant mutualism in three sympatric varieties of *Chamaecrista desvauxii*. *Journal of Ecology*, **100**, 242–252.
- Barônio, G.J. & Torezan-Silingardi, H.M. (2016) Temporal niche overlap and distinct bee ability to collect floral resources on three species of Brazilian Malpighiaceae. *Apidologie*. (In press).
- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B. & Walker, S. (2015) Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software*, **67**, 1-48.
- Biesmeijer, J.C., Richter, J.A.P., Smeets, M. & Sommeijer, M.J. (1999) Niche differentiation in nectar-collecting stingless bees: the influence of morphology, oral choice and interference competition. *Ecological Entomology*, **24**, 380–388.
- Blüthgen, N., Stork, N.E., Fiedler, A.K., Blu, N., Stork, N.E., Fiedler, K., *et al.* (2004) Bottom-up control and co-occurrence in complex communities: honeydew and nectar determine a rainforest ant mosaic. *Oikos*, **106**, 344–358.
- Boas, J.C.V., Fava, W.S., Laroca, S. & Sigris, M.R. (2013) Two sympatric *Byrsonima* species (Malpighiaceae) differ in phenological and reproductive patterns. *Flora (Jena)*, **208**, 360–369.
- Brito, A. F.F., Presley, S.J.J. & Santos, G.M.M. (2012) Temporal and trophic niche overlap in a guild of flower-visiting ants in a seasonal semi-arid tropical environment. *Journal of*

- Arid Environments*, **87**, 161–167.
- Bronstein, J.L. (1994) Conditional outcomes in mutualistic interactions. *Trends in Ecology and Evolution*, **9**, 214–217.
- 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*, **3**, 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 (Jena)*, **212**, 19–23.
- Cappellari, S.C., Melo, G.A.R., Aguiar, A.J.C. & Neff, J.L. (2012) Floral oil collection by male *Tetrapedia* bees (Hymenoptera: Apidae: Tetrapediini). *Apidologie*, **43**, 39–50.
- Castro-Arellano, I., Lacher, T.E., Willig, M.R. & Rangel, T.F. (2010) Assessment of assemblage-wide temporal niche segregation using null models. *Methods in Ecology and Evolution*, **1**, 311–318.
- Cembrowski, A.R., Tan, M.G., Thomson, J.D. & Frederickson, M.E. (2014) Ants and ant scent reduce bumblebee pollination of artificial flowers. *The American naturalist*, **183**, 133–9.
- Cosacov, A., Nattero, J. & Cocucci, A.A. a. (2008) Variation of pollinator assemblages and pollen limitation in a locally specialized system: The oil-producing *Nierembergia linariifolia* (Solanaceae). *Annals of Botany*, **102**, 723–734.
- Crawley, M.J. (1983) *Herbivory: the dynamics of animal-plant interactions - studies in ecology*.
- Crawley, M.J. (2012) *The R book*.
- Dáttilo, W., Aguirre, A., Flores-Flores, R.V., Fagundes, R., Lange, D., García-Chávez, J., *et al.*

- (2015) Secretory activity of extrafloral nectaries shaping multitrophic ant-plant-herbivore interactions in an arid environment. *Journal of Arid Environments*, **114**, 104–109.
- Dáttilo, W., Aguirre, A., la Torre, P.L. De, Kaminski, L.A., García-Chávez, J. & Rico-Gray, V. (2016) Trait-mediated indirect interactions of ant shape on the attack of caterpillars and fruits. *Biology letters*, **12**, 20160401.
- Del-Claro, K. & Marquis, R.J. (2015) Ant Species Identity has a Greater Effect than Fire on the Outcome of an Ant Protection System in Brazilian Cerrado. *Biotropica*, **47**, 459–467.
- Del-Claro, K. & Oliveira, P.S. (2000) Conditional outcomes in a neotropical treehopper-ant association: temporal and species-specific variation in ant protection and hemipteran fecundity. *Oecologia*, **124**, 156–165.
- Del-Claro, K., Rico-Gray, V., Torezan-Silingardi, H.M., Alves-Silva, E., Fagundes, R., Lange, D., *et al.* (2016) Loss and gains in ant–plant interactions mediated by extrafloral nectar: fidelity, cheats, and lies. *Insectes Sociaux*, **63**, 207–221.
- Dworschak, K., Blüthgen, N., Entomology, E., Dworschak, K. & Blüthgen, N. (2010) Networks and dominance hierarchies: Does interspecific aggression explain flower partitioning among stingless bees? *Ecological Entomology*, **35**, 216–225.
- Ferreira, C.A. & Torezan-Silingardi, H.M. (2013) Implications of the floral herbivory on malpighiacea plant fitness: Visual aspect of the flower affects the attractiveness to pollinators. *Sociobiology*, **60**, 323–328.
- Fournier, L.A. (1974) Un método cuantitativo para la medición de características fenológicas em árboles. *Turrialba*, **24**, 422–423.
- Galen, C. & Geib, J.C. (2007) Density-dependent effects of ants on selection for bumblebee pollination in *Polemonium viscosum*. *Ecology*, **88**, 1202–1209.

- Santos G.M.M., Carvalho, C.A.L., Aguiar, C.M.L., et al (2013) Overlap in trophic and temporal niches in the flower-visiting bee guild (Hymenoptera, Apoidea) of a tropical dry forest. *Apidologie*, **44**, 64–74.
- Gonzálvez, F.G., Santamaría, L., Corlett, R.T., Rodríguez-gironés, M. a., Experimental, E., Áridas, D.Z., *et al.* (2013) Flowers attract weaver ants that deter less effective pollinators. *Journal of Ecology*, **101**, 78–85.
- Gottsberger, G. & Silberbauer-Gottsberger, I. (2006) *Life in the Cerrado: a South American Tropical Seasonal Vegetation. Vol. I - Origin, Structure, Dynamics and Plant Use.* Germany.
- Harder, L.D. & Barrett, S.C. (2006) *Ecology and evolution of flowers.* Oxford University Press, New York.
- Holland, J.N., Chamberlain, S.A. & Miller, T.E.X. (2011) Consequences of ants and extrafloral nectar for a pollinating seed-consuming mutualism: ant satiation, floral distraction or plant defense? *Oikos*, **120**, 381–388.
- Janzen, D.H. (1975) *The ecology of plants in the tropics.* Edward Arnold, Londres.
- Junker, R., Chung, A.Y.C. & Blüthgen, N. (2007) Interaction between flowers, ants and pollinators: additional evidence for floral repellence against ants. *Ecological Research*, **22**, 665–670.
- Junker, R.R. & Blüthgen, N. (2010) Floral scents repel facultative flower visitors, but attract obligate ones. *Annals of botany*, **105**, 777–82.
- Kaminski, L.A. & Freitas, A.V.L. (2010) Natural history and morphology of immature stages of the butterfly *Allosmaitia strophius* (Godart) (Lepidoptera: Lycaenidae) on flower buds of Malpighiaceae. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, **45**, 11–19.
- Karron, J.D., Holmquist, K.G., Flanagan, R.J. & Mitchell, R.J. (2009) Pollinator visitation patterns strongly influence among-flower variation in selfing rate. *Annals of botany*, **103**,

1379–1383.

Lanan, M.C. & Bronstein, J.L. (2013) An ant's-eye view of an ant-plant protection mutualism. *Oecologia*, **172**, 779–90.

Lange, D., Calixto, E.S. & Del-Claro, K. (2017) Variation in extrafloral nectary productivity influences the ant foraging. *PLoS One*, **12**, e0169492.

Lange, D., Dáttilo, W. & Del-Claro, K. (2013) Influence of extrafloral nectary phenology on ant-plant mutualistic networks in a neotropical savanna. *Ecological Entomology*, **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.

Li, J., Wang, Z., Tan, K., Qu, Y. & Nieh, J.C. (2014) Giant Asian honeybees use olfactory eavesdropping to detect and avoid ant predators. *Animal Behaviour*, **97**, 69–76.

Lunau, K., Unseld, K. & Wolter, F. (2009) Visual detection of diminutive floral guides in the bumblebee *Bombus terrestris* and in the honeybee *Apis mellifera*. *Journal of Comparative Physiology A*, **195**, 1121–1130.

Mamede, M.C.H., Amorim, A.M. & Sebastiani, R. (2014) Malpighiaceae. *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. URL <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB155> [accessed on 2016].

Mello, M.A.R., Bezerra, E.L.S. & Machado, I.C. (2013) Functional Roles of Centridini Oil Bees and Malpighiaceae Oil Flowers in Biome-wide Pollination Networks. *Biotropica*, **45**, 45–53.

Mendes, F.N., Rêgo, M.M.C. & Albuquerque, P.M.C. De. (2011) Fenologia e biologia reprodutiva de duas espécies de *Byrsonima* Rich. (Malpighiaceae) em área de Cerrado no Nordeste do Brasil. *Biota Neotropica*, **11**, 103–115.

- Mitchell, R.J., Irwin, R.E., Flanagan, R.J. & Karron, J.D. (2009) Ecology and evolution of plant-pollinator interactions. *Annals of Botany*, **103**, 1355–1363.
- Ness, J.H. (2006) A mutualism's indirect costs: the most aggressive plant bodyguards also deter pollinators. *Oikos*, **113**, 506–514.
- Nogueira, A., Rey, P.J., Alcántara, J.M., Feitosa, R.M. & Lohmann, L.G. (2015) Geographic mosaic of plant evolution: Extrafloral nectary variation mediated by ant and herbivore assemblages. *PLoS One*, **10**, 1–24.
- Peter, C.I. & Johnson, S.D. (2008) Mimics and magnets: The importance of color and ecological facilitation in floral deception. *Ecology*, **89**, 1583–1595.
- Pianka, E.R. (1973) The structure of lizard communities. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **4**, 53–74.
- Polatto, L.P., Chaud-Netto, J. & Alves-Junior, V. V. (2014) Influence of Abiotic Factors and Floral Resource Availability on Daily Foraging Activity of Bees: Influence of Abiotic and Biotic Factors on Bees. *Journal of Insect Behavior*, **27**, 593–612.
- Rech, A.R., Kayna, A., Oliveira, P.E. & Machado, I.C. (2014) *Biologia da polinização*. Ministério do Meio Ambiente, Brasília. 527p.
- Renault, C.K., Buffa, L.M. & Delfino, M. a. (2005) An aphid-ant interaction: effects on different trophic levels. *Ecological Research*, **20**, 71–74.
- Réu, W.F., Del-Claro, K. & Reu, W.F. (2005) Natural history and biology of *Chlamisus minax* Lacordaire (Chrysomelidae : Chlamisinae). *Neotropical Entomology*, **34**, 357–362.
- Schäffler, I. & Dötterl, S. (2011) A day in the life of an oil bee: Phenology, nesting, and foraging behavior. *Apidologie*, **42**, 409–424.
- Schoereder, J., Sobrinho, T., Madureira, M., Ribas, C. & Oliveira, P. (2010) The arboreal ant community visiting extrafloral nectaries in the Neotropical cerrado savanna. *Terrestrial Arthropod Reviews*, **3**, 3–27.

- Shenoy, M., Radhika, V., Satish, S. & Borges, R.M. (2012) Composition of extrafloral nectar influences interactions between the myrmecophyte *Humboldtia brunonis* and its ant associates. *Journal of chemical ecology*, **38**, 88–99.
- Sigrist, M.R. & Sazima, M. (2004) Pollination and reproductive biology of twelve species of neotropical malpighiaceae: Stigma morphology and its implications for the breeding system. *Annals of Botany*, **94**, 33–41.
- Stefani, V., Pires, T.L., Torezan-Silingardi, H.M. & Del-Claro, K. (2015) Beneficial Effects of Ants and Spiders on the Reproductive Value of *Eriotheca gracilipes* (Malvaceae) in a Tropical Savanna. *PLOS One*, **10**, e0131843.
- TeamCore-R. (2015) R: A language and environment for statistical computing.
- Torezan-Silingardi, H.M. (2012) Flores e animais: uma introdução à história natural da polinização. In *Ecologia Evolutiva das Interações Plantas-Animais: Uma abordagem ecológico-evolutiva* (ed. by Claro, K. Del & Torezan-Silingardi, H.M.). Technical Books Editora, Rio de Janeiro, pp. 111–139.
- Velasque, M. & Del-Claro, K. (2016) Host plant phenology may determine the abundance of an ecosystem engineering herbivore in a tropical savanna. *Ecological Entomology*, **41**, 421–430.
- Vilela, A.A., Torezan-Silingardi, H.M. & Claro, K. Del. (2014) Conditional outcomes in ant-plant-herbivore interactions influenced by sequential flowering. *Flora (Jena)*, **209**, 359–366.
- Vogel, S. (1974) Olblumen und olsammelnde Bienen. *Tropische und Subtropische Pflanzenwelt*, **7**, 285–547.
- Vogel, S. (1990) History of the malpighiaceae in the light of pollination ecology. *Memoirs of the New York Botanical Garden*, **50**, 130–142.
- Wagner, D. & Kay, A. (2002) Do extrafloral nectaries distract ants from visiting flowers? An

experimental test of an overlooked hypothesis. *Evolutionary Ecology Research*, **4**, 293–305.

Wardhaugh, C.W. (2015) How many species of arthropods visit flowers? *Arthropod-Plant Interactions*, **9**, 547–565.

Zar, J.H. (2010) *Biostatistical Analysis*. 5th Ed. Pearson Prentice Hall, New Jersey.

Zuur, A.F., Ieno, E.N., Walker, N.J., Saveliev, A.. & Smith, G.M. (2009) *Mixed effects and extensions in ecology with R*.

Table 1 Phenological overlaps between ants, extrafloral nectaries (EFNs) and flowers on two Malpighiaceae species (*Banisteriopsis malifolia* and *B. campestris*) in the Cerrado savannah, Uberlândia, MG, Brazil. The numbers above the main diagonal are statistical values from the Watson-Wheeler test and the values below the diagonal show the p -value. Observe that for circular mean tests, values of p less than 0.05 show us that the means differ on their mean angles, showing no overlap.

<i>Banisteriopsis malifolia</i>			
	EFNs	Flowers	Ants
EFNs	-	10.398	12.686
Flowers	0.005*	-	4.151
Ants	0.001*	0.125	-
<i>Banisteriopsis campestris</i>			
	EFNs	Flowers	Ants
EFNs	-	10.398	10.398
Flowers	0.005*	-	1.324
Ants	0.005*	0.515	-

*Indicates overlapping phenological events

df = 2 for all tests

Table 2 Results of the significance of the mean pairwise temporal niche overlap between species visiting flowers of *Banisteriopsis malifolia* and *B. campestris* according to the null model ROSARIO. The *p*-values represent the significance of the niche overlap mean when it was higher than that expected by chance.

	Treatment	Observed mean (Pianka index)	Simulated mean (Pianka index)	<i>p</i> -value
<i>B. malifolia</i>	Ant presence	0.3440	0.2724	0.0033
	Ant exclusion	0.3530	0.2966	0.0019
<i>B. campestris</i>	Ant presence	0.3178	0.2861	0.0532
	Ant exclusion	0.3705	0.3230	0.0127

Table 3 Model effect of ant treatments on pairwise oil-collecting bee temporal niche overlap of two Malpighiaceae species in the Cerrado savannah from Uberlândia, MG, Brazil.

	Fixed effect	Estimate	Standard error	z-value	p-value
<i>B. malifolia</i>	Intercept	3.209	0.074	43.48	< 0.0001
	Ant effect	0.025	0.020	1.27	0.205
<i>B. campestris</i>	Intercept	3.228	0.066	48.54	< 0.0001
	Ant effect	0.154	0.018	8.39	< 0.0001

Table 4 Model effects of ant abundance on floral visitation rates and plant reproductive fitness of two Malpighiaceae species in the Cerrado savannah from Uberlândia, MG, Brazil.

		Fixed effects	Estimate	Standard error	z-value	p-value
<i>B. malifolia</i>	Number of floral visits	Intercept (density 0)	3.07	0.18	17.071	< 0.001
		Density 5	-0.08	0.14	-0.618	0.537
		Density 10	-0.50	0.22	-2.311	0.020
		Density 30	-2.74	0.32	-8.618	< 0.001
	Fruit set	Intercept (density 0)	4.21	0.08	51.04	< 0.001
		Density 5	-0.12	0.08	-1.5	0.133
		Density 10	-0.06	0.09	-0.63	0.530
		Density 30	-0.28	0.09	-3	0.002
	Duration of visit	Intercept (density 0)	0.74	0.21	3.4	< 0.001
		Density 5	-0.04	0.31	-0.15	0.875
		Density 10	-0.40	0.35	-1.17	0.239
		Density 30	-0.40	0.35	-1.17	0.239
<i>B. campestris</i>	Number of floral visits	Intercept (density 0)	3.16	0.18	17.38	< 0.001
		Density 5	-1.05	0.22	-4.64	< 0.001
		Density 10	-1.37	0.24	-5.66	< 0.001
		Density 30	-1.87	0.30	-6.19	< 0.001
	Fruit set	Intercept (density 0)	3.25	0.18	17.314	< 0.001
		Density 5	-0.08	0.12	-0.683	0.494
		Density 10	0.96	0.13	6.95	< 0.001
		Density 30	0.78	0.26	2.946	0.003
	Duration of visit	Intercept (density 0)	1.51	0.21	7.231	< 0.001
		Density 5	-0.90	0.31	-2.938	0.003
		Density 10	-0.71	0.30	-2.368	0.017
		Density 30	-0.86	0.34	-2.502	0.012

Figure legends

Fig. 1 Phenological intensity overlaps between extrafloral nectaries (EFNs), flowers and ant abundance on *Banisteriopsis campestris* and *B. malifolia* which were observed from April 2013 to March 2014 in the Cerrado savannah of Uberlândia, MG, Brazil. Arrows indicate the mean concentration (r) and the length of the arrow represents the intensity.

Fig. 2 Oil-collecting bee visits received by (A) *Banisteriopsis malifolia* and (B) *Banisteriopsis campestris* in Cerrado savannah, Uberlândia, MG, Brazil.

Fig. 3 General linear mixed model including the number of active extrafloral nectaries and flowers as random variables, showing the effect of ant abundance on floral visitation to two Malpighiaceae species: (A) *Banisteriopsis malifolia* and (B) *Banisteriopsis campestris* in the Cerrado, Uberlândia, MG, Brazil.

Fig. 4 General linear mixed model including flower number as a random variable, showing the effect of ant density on bee visitation and plant reproductive fitness in the Malpighiaceae species *Banisteriopsis malifolia* (black circles) and *Banisteriopsis campestris* (white circles) in Cerrado savannah, Uberlândia, MG, Brazil. Graphs illustrate mean \pm standard error and different letters show statistical significance.

Figure 1

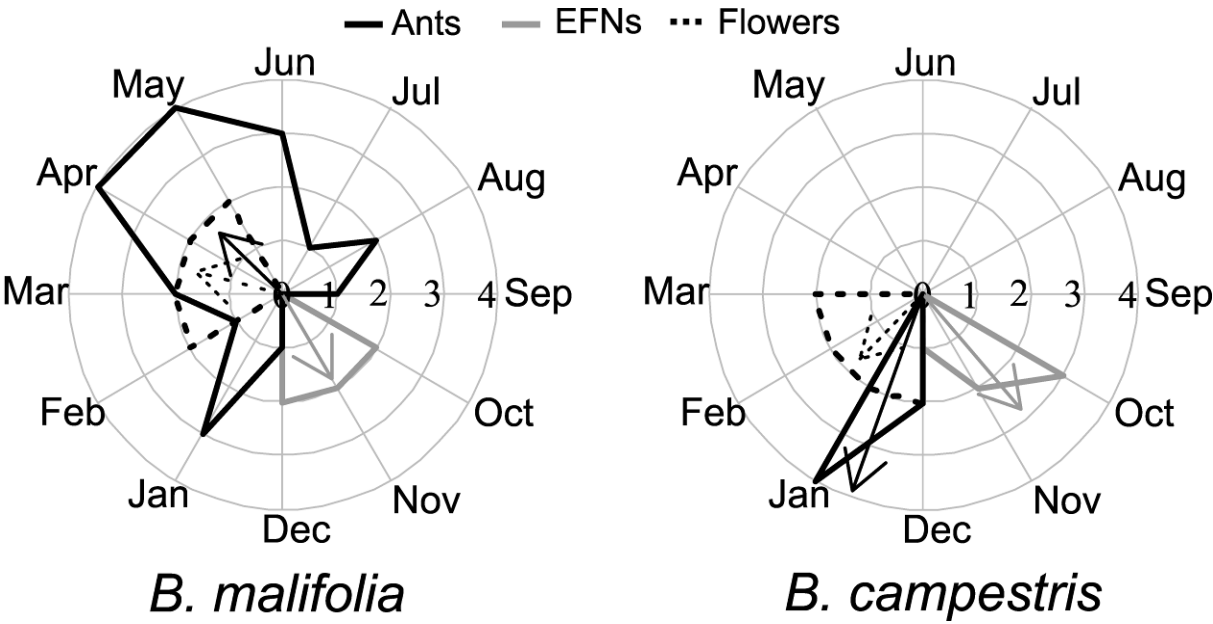


Figure 2

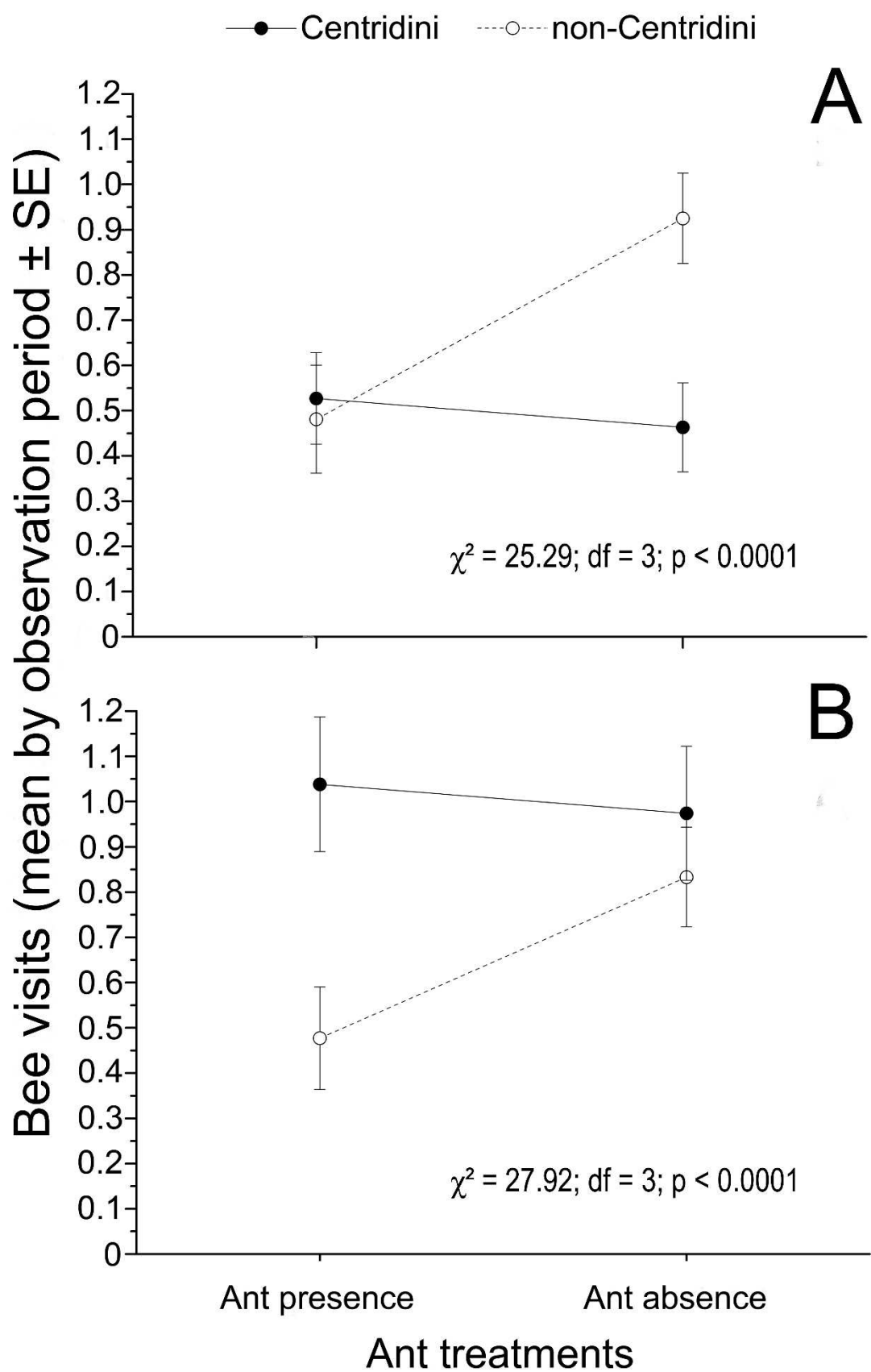


Figure 3

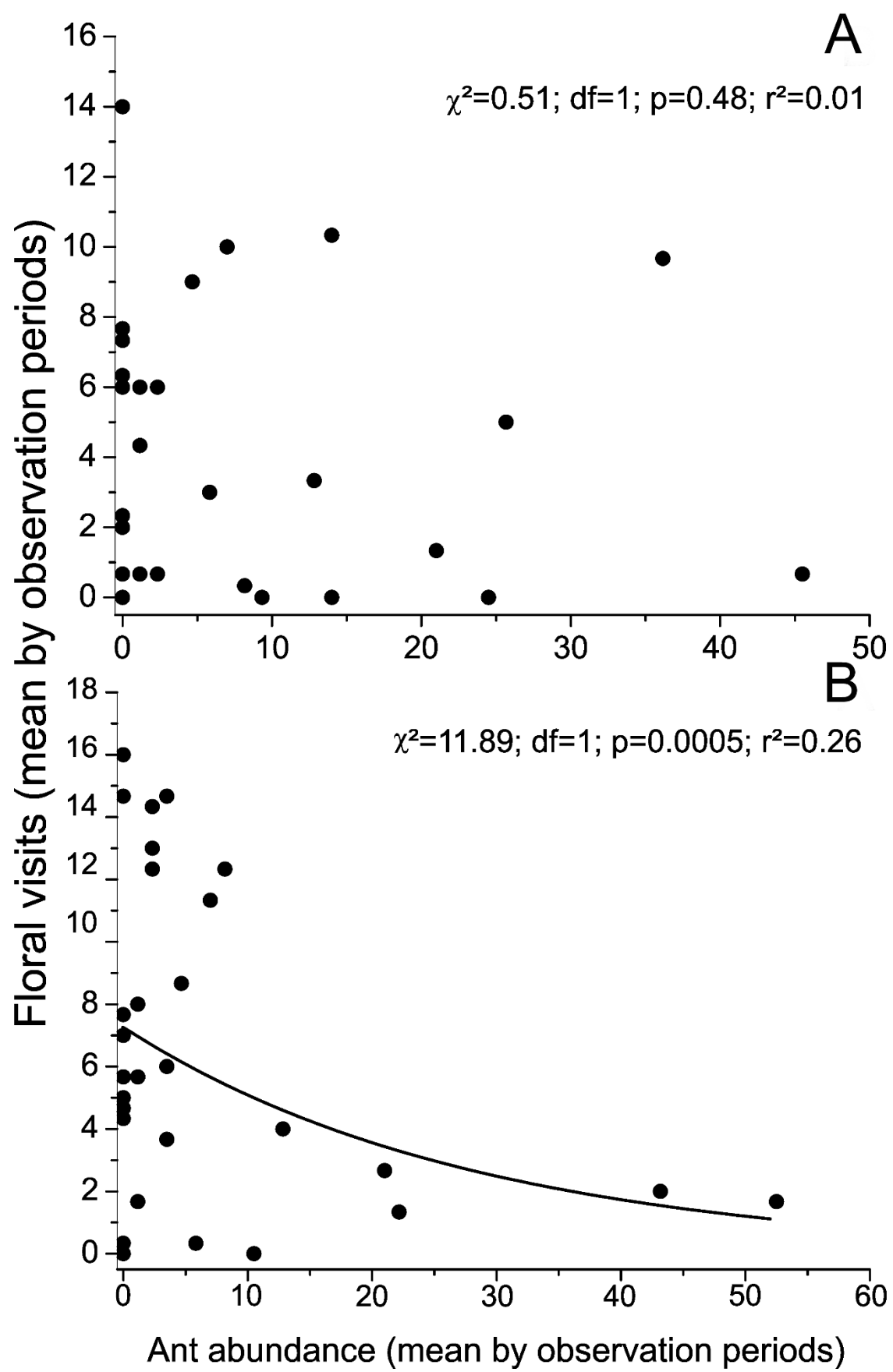
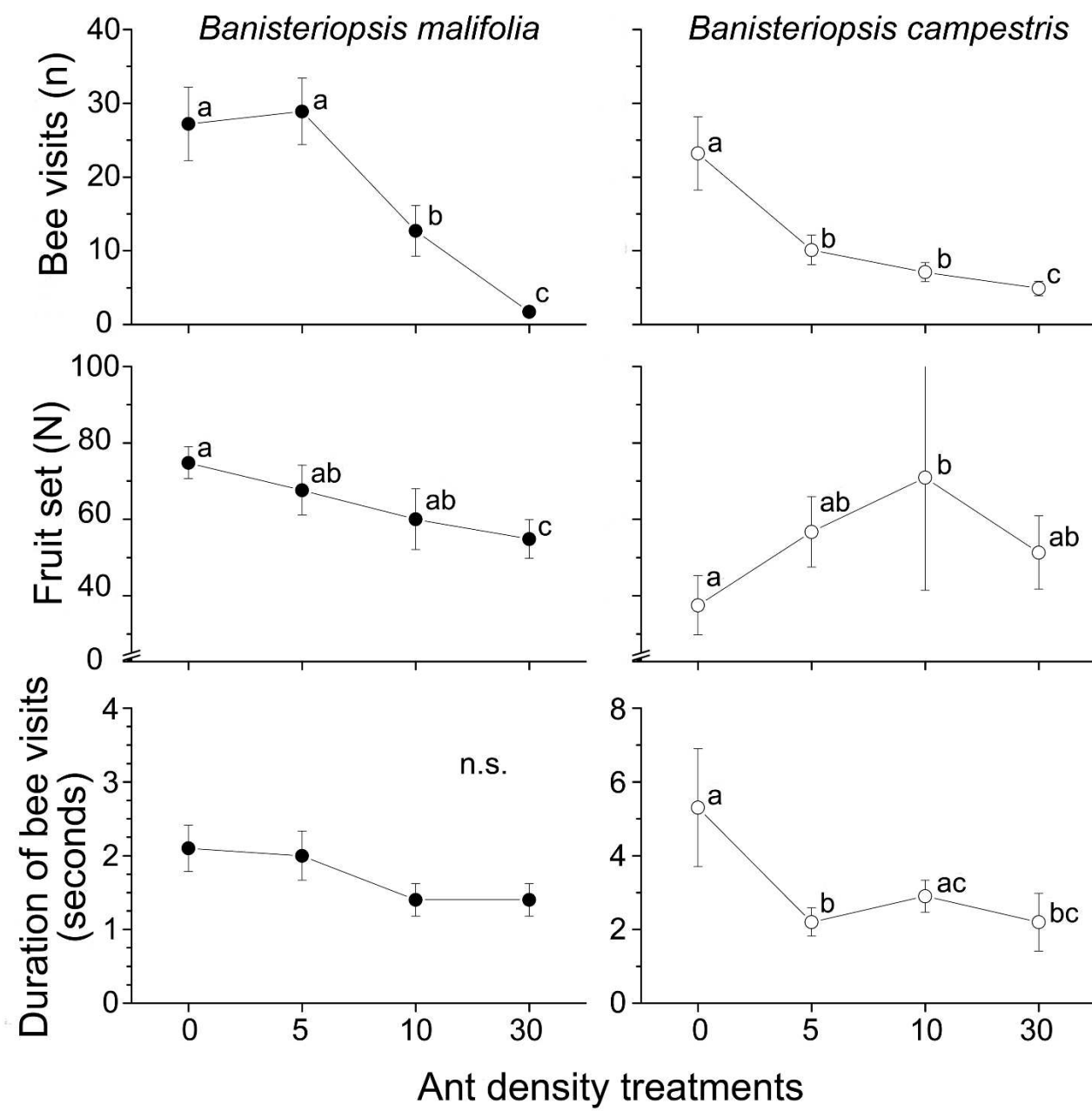
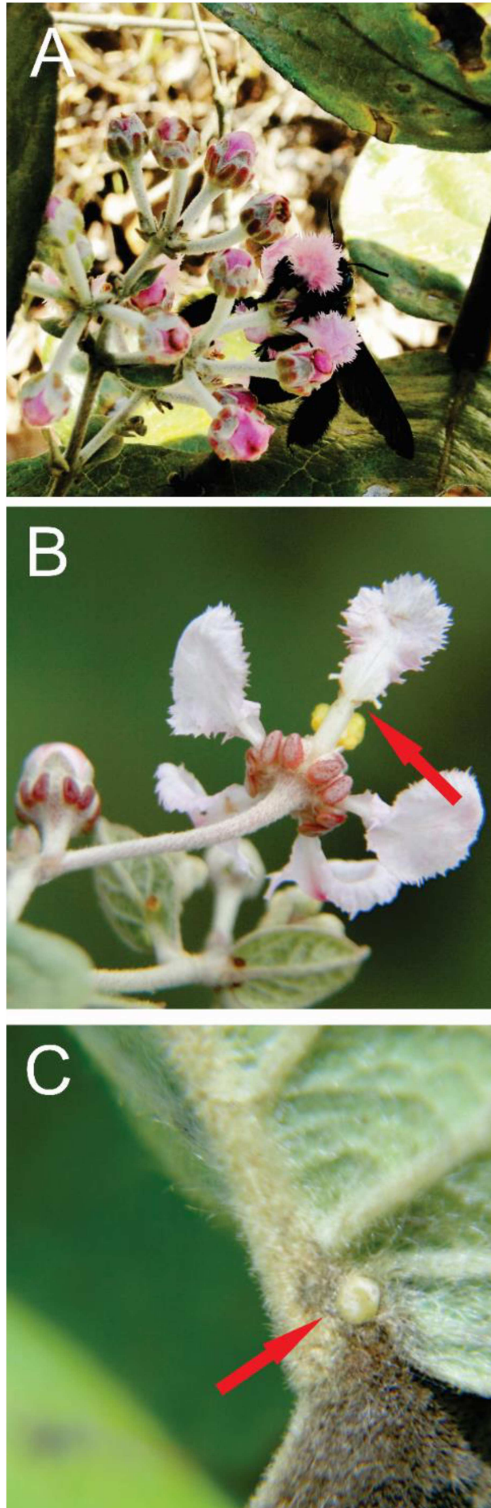


Figure 4



Supplementary Material 1. The *Centris* bee showing the typical behaviour of oil-collecting bees during oil-harvesting on a *Banisteriospsis malifolia* flower (A). A *Banisteriospsis campestris* flower recently visited closing on oil glands (B), the recent visit can be deduced from their whitish aspect and the mark left by the Centridini mandible (red arrow) during visitation. We also may observe extrafloral nectaries located at the base of leaves, illustrated here by close on *B. malifolia* leave (C).



Supplementary Material 2. Table showing all bee species observed in treatments with and without ants on *Banisteriopsis campestris* and *Banisteriopsis malifolia*.

Oil collecting bee visitor	Plant species	Treatment
<i>Centris (Melacentris) dorsata</i>	<i>Banisteriopsis campestris</i>	without ants
<i>Centris (Ptilotopus) scopipes</i>	<i>Banisteriopsis campestris</i>	without ants
<i>Centris (Ptilotopus) spona</i>	<i>Banisteriopsis campestris</i>	without ants
<i>Epicharis (Epicharana) flava</i>	<i>Banisteriopsis campestris</i>	without ants
<i>Epicharis (Epicharitides) iheringi</i>	<i>Banisteriopsis campestris</i>	without ants
<i>Epicharis (Triepicharis) analis</i>	<i>Banisteriopsis campestris</i>	without ants
<i>Epicharis bicolor</i>	<i>Banisteriopsis campestris</i>	without ants
<i>Exomalopsis auropilosa</i>	<i>Banisteriopsis campestris</i>	without ants
<i>Monoeca aff brasiliensis</i>	<i>Banisteriopsis campestris</i>	without ants
<i>Paratrigona lineata</i>	<i>Banisteriopsis campestris</i>	without ants
<i>Tetrapedia curvitaris</i>	<i>Banisteriopsis campestris</i>	without ants
<i>Tetrapedia diversipes</i>	<i>Banisteriopsis campestris</i>	without ants
<i>Tetrapedia sp. 1</i>	<i>Banisteriopsis campestris</i>	without ants
<i>Trigona spinipes</i>	<i>Banisteriopsis campestris</i>	without ants
<i>Trigonisca sp. 1</i>	<i>Banisteriopsis campestris</i>	without ants
<i>Tripodopoda carinata</i>	<i>Banisteriopsis campestris</i>	without ants
<i>Tripodopoda flavolineata</i>	<i>Banisteriopsis campestris</i>	without ants
<i>Tripodopoda nicrocarinata</i>	<i>Banisteriopsis campestris</i>	without ants
<i>Tripodopoda punctifrons</i>	<i>Banisteriopsis campestris</i>	without ants
<i>Centris (Melacentris) dorsata</i>	<i>Banisteriopsis campestris</i>	with ants
<i>Centris (Ptilotopus) scopipes</i>	<i>Banisteriopsis campestris</i>	with ants
<i>Centris (Ptilotopus) spona</i>	<i>Banisteriopsis campestris</i>	with ants
<i>Epicharis (Epicharana) flava</i>	<i>Banisteriopsis campestris</i>	with ants
<i>Epicharis (Epicharitides) iheringi</i>	<i>Banisteriopsis campestris</i>	with ants
<i>Epicharis (Triepicharis) analis</i>	<i>Banisteriopsis campestris</i>	with ants
<i>Epicharis bicolor</i>	<i>Banisteriopsis campestris</i>	with ants
<i>Exomalopsis auropilosa</i>	<i>Banisteriopsis campestris</i>	with ants
<i>Monoeca aff brasiliensis</i>	<i>Banisteriopsis campestris</i>	with ants
<i>Paratrigona lineata</i>	<i>Banisteriopsis campestris</i>	with ants
<i>Tetrapedia curvitaris</i>	<i>Banisteriopsis campestris</i>	with ants
<i>Tetrapedia diversipes</i>	<i>Banisteriopsis campestris</i>	with ants
<i>Tetrapedia sp. 1</i>	<i>Banisteriopsis campestris</i>	with ants
<i>Trigona spinipes</i>	<i>Banisteriopsis campestris</i>	with ants
<i>Trigonisca sp. 1</i>	<i>Banisteriopsis campestris</i>	with ants
<i>Tripodopoda carinata</i>	<i>Banisteriopsis campestris</i>	with ants
<i>Tripodopoda flavolineata</i>	<i>Banisteriopsis campestris</i>	with ants
<i>Tripodopoda nicrocarinata</i>	<i>Banisteriopsis campestris</i>	with ants
<i>Tripodopoda punctifrons</i>	<i>Banisteriopsis campestris</i>	with ants
<i>Centris (Melacentris) collaris</i>	<i>Banisteriopsis malifolia</i>	without ants
<i>Centris (Melacentris) dorsata</i>	<i>Banisteriopsis malifolia</i>	without ants
<i>Centris (Ptilotopus) scopipes</i>	<i>Banisteriopsis malifolia</i>	without ants
<i>Centris (Ptilotopus) spona</i>	<i>Banisteriopsis malifolia</i>	without ants

<i>Centris (Trachina) dentata</i>	<i>Banisteriopsis malifolia</i>	without ants
<i>Centris (Trachina) fuscata</i>	<i>Banisteriopsis malifolia</i>	without ants
<i>Centris (Trachina) machadoi</i>	<i>Banisteriopsis malifolia</i>	without ants
<i>Epicharis (Epicharana) flava</i>	<i>Banisteriopsis malifolia</i>	without ants
<i>Epicharis (Epicharitides) iheringi</i>	<i>Banisteriopsis malifolia</i>	without ants
<i>Epicharis (Triepicharis) analis</i>	<i>Banisteriopsis malifolia</i>	without ants
<i>Epicharis bicolor</i>	<i>Banisteriopsis malifolia</i>	without ants
<i>Lophopedia pygmaea</i>	<i>Banisteriopsis malifolia</i>	without ants
<i>Monoeca aff brasiliensis</i>	<i>Banisteriopsis malifolia</i>	without ants
<i>Paratetrapedia sp. 1</i>	<i>Banisteriopsis malifolia</i>	without ants
<i>Paratrigona lineata</i>	<i>Banisteriopsis malifolia</i>	without ants
<i>Tetrapedia curvitaris</i>	<i>Banisteriopsis malifolia</i>	without ants
<i>Tetrapedia diversipes</i>	<i>Banisteriopsis malifolia</i>	without ants
<i>Tetrapedia sp. 1</i>	<i>Banisteriopsis malifolia</i>	without ants
<i>Trigona spinipes</i>	<i>Banisteriopsis malifolia</i>	without ants
<i>Trigonisca sp. 1</i>	<i>Banisteriopsis malifolia</i>	without ants
<i>Tripodopedia carinata</i>	<i>Banisteriopsis malifolia</i>	without ants
<i>Tropidopedia flavolineata</i>	<i>Banisteriopsis malifolia</i>	without ants
<i>Centris (Melacentris) collaris</i>	<i>Banisteriopsis malifolia</i>	with ants
<i>Centris (Melacentris) dorsata</i>	<i>Banisteriopsis malifolia</i>	with ants
<i>Centris (Ptilotopus) scopipes</i>	<i>Banisteriopsis malifolia</i>	with ants
<i>Centris (Ptilotopus) sponsa</i>	<i>Banisteriopsis malifolia</i>	with ants
<i>Centris (Trachina) dentata</i>	<i>Banisteriopsis malifolia</i>	with ants
<i>Centris (Trachina) fuscata</i>	<i>Banisteriopsis malifolia</i>	with ants
<i>Centris (Trachina) machadoi</i>	<i>Banisteriopsis malifolia</i>	with ants
<i>Epicharis (Epicharana) flava</i>	<i>Banisteriopsis malifolia</i>	with ants
<i>Centris varia</i>	<i>Banisteriopsis malifolia</i>	with ants
<i>Epicharis (Triepicharis) analis</i>	<i>Banisteriopsis malifolia</i>	with ants
<i>Epicharis bicolor</i>	<i>Banisteriopsis malifolia</i>	with ants
<i>Lophopedia pygmaea</i>	<i>Banisteriopsis malifolia</i>	with ants
<i>Monoeca aff brasiliensis</i>	<i>Banisteriopsis malifolia</i>	with ants
<i>Paratetrapedia sp.1</i>	<i>Banisteriopsis malifolia</i>	with ants
<i>Paratrigona lineata</i>	<i>Banisteriopsis malifolia</i>	with ants
<i>Tetrapedia curvitaris</i>	<i>Banisteriopsis malifolia</i>	with ants
<i>Trigona spinipes</i>	<i>Banisteriopsis malifolia</i>	with ants

CAPÍTULO 2

Gudryan J. Barônio^{1,*}

Kleber Del-Claro^{1,2}

Simetria floral como guia cognitivo para os visitantes florais: ligações com a disponibilidade de recursos e o ajuste com características vegetativas

¹ Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais, Universidade Federal de Uberlândia, Campus Umuarama, R: Ceará, S/N, Bloco 2D, CEP 38400-902 – Uberlândia – Minas Gerais – Brazil.

² Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia, Campus Umuarama, R: Ceará, S/N, Bloco 2D, CEP 38400-902 – Uberlândia – Minas Gerais – Brazil.

* gudryan@gmail.com

Resumo

A morfologia floral atua fortemente sobre a capacidade cognitiva dos animais em reconhecer os caracteres florais e associá-los aos recursos disponíveis e de acordo com o modo como apresentada, pode influenciar a atratividade das flores aos polinizadores. A simetria floral parece estar relacionada com a taxa de transferência de pólen, flores simétricas em geral tem maior produção de néctar são frequentemente mais visitadas pelos polinizadores resultando em maiores taxas de formação de frutos. Pressupõe-se assim uma forte seleção positiva da simetria floral devido à capacidade cognitiva associativa dos visitantes florais. Estudos dessa natureza são ainda poucos e, portanto não se tem dados suficientes para que se estabeleça um padrão. Assim sendo, hipotetizamos que na savana tropical, por ser um ambiente aberto e de fácil visualização das flores, que a simetria floral seja uma importante característica de seleção pelos polinizadores e sirva como um indicativo de flores com melhor qualidade e quantidade de recursos. O estudo foi realizado entre março de 2013 e abril de 2014 em uma reserva de cerrado *sensu stricto* no sudeste brasileiro utilizando duas espécies de Malpighiaceae: *Banisteriopsis campestris* e *B. malifolia*, cujo principal recurso floral é o óleo presente em glândulas na base das sépalas. Fizemos testes comparando a simetria de caracteres reprodutivos e vegetativos e entre flores visitadas e não visitadas durante a primeira aproximação do visitante. Relacionamos ainda a disponibilidade de recursos florais e a assimetria floral. As duas espécies estudadas apresentaram maior ajuste entre caracteres reprodutivos do que entre caracteres vegetativos, ambas tiveram níveis de assimetria foliar maiores que os florais. Em *Banisteriopsis campestris*, a diferença na simetria entre flores visitadas e não visitadas foi diferente apenas nas medidas das pétala estandarte. No entanto, não houve indicativo de relação entre a disponibilidade de recurso e a assimetria do caracteres estudados. De acordo com a elevada importância da pétala estandarte para as abelhas durante a coleta de recursos florais, a escolha de flores com pétalas estandarte mais vigorosas deve ser um comportamento constante. No entanto, considerando que a preferência por algum sinal floral pode ser rapidamente alterada pelo aprendizado associativo dos visitantes, na falta de uma relação entre simetria e a disponibilidade dos recursos florais pressupõe-se que a seleção de flores durante a primeira visita na planta ocorra majoritariamente de acordo com a abundância de flores e seus diferentes níveis de simetria.

Palavras-chave: Assimetria floral, Centridini, Ecologia cognitiva, Malpighiaceae, Óleo floral.

Introdução

A atratividade das flores aos polinizadores é resultado do modo como a sua morfologia atua sobre a capacidade cognitiva dos animais em reconhecer os caracteres florais e associá-los aos recursos disponíveis (Harder & Barrett, 2006; Peter & Johnson, 2008; Lunau *et al.*, 2009; Torezan-Silingardi, 2012). Os recursos florais, que podem ser o néctar, pólen, óleos, dentre outros, geralmente intermediam a relação planta-polinizador servindo como recompensa aos visitantes que realizam os serviços de polinização (Pellmyr, 2002; Harder & Barrett, 2006; Torezan-Silingardi, 2012). Dessa forma, as espécies de planta e polinizadores de uma comunidade estão relacionadas pelos recursos produzidos e consumidos na qual há possibilidade de utilização de um mesmo recurso por várias espécies (Vázquez *et al.*, 2009; Mello *et al.*, 2013; Barônio & Torezan-Silingardi, 2016). A obtenção dos recursos florais é mediada não somente pelo comportamento dos visitantes, mas também pelas características morfológicas das flores (Hirota *et al.*, 2013; Brito *et al.*, 2014), que ao longo do processo evolutivo podem moldar esses comportamentos (Thompson, 1994, 2005).

A variação morfológica observada nas flores tem grande importância para os visitantes, que em alguns casos exibem adaptações intrínsecas para uma visita mais efetiva em alguns tipos de flores do que em outras (e.g. abelhas Centridini e flores de Malpighiaceae) (Vogel, 1988; Chittka & Raine, 2006). Os polinizadores associam múltiplas características florais com os níveis de recursos disponíveis (Lavery, 1994; Gumbert, 2000; Rodríguez *et al.*, 2004) e invariavelmente há a possibilidade de serem enganados por sinais florais utilizados apenas como atrativos (Leonard & Papaj, 2011; Leonard & Masek, 2014; Varassin & Amaral-Neto, 2014).

As distintas pressões evolutivas sofridas pelas plantas (e.g. predação por herbívoros, estresse hídrico e climático, competição) podem causar variações morfológicas (Palmer *et al.*, 1986; Graham *et al.*, 2010). Essas variações podem ser assimetrias, que são pequenas diferenças aleatórias na simetria dos caracteres, seja ela bilateral, axial ou rotacional (Neal *et al.*, 1998; Frey *et al.*, 2003; Savriama & Klingenberg, 2011). Elas têm sido utilizadas em vários estudos como medida de

instabilidade durante o desenvolvimento (Markow, 1994; Graham *et al.*, 2010) e como previsões para os resultados de interações como a herbivoria (Cornelissen & Stiling, 2005, 2011; Alves-Silva & Del-Claro, 2016b), no qual a assimetria foliar é um indicador para os herbívoros de folhas com maior qualidade nutricional e menor capacidade de defesa química ou física (Price, 1991; Cornelissen & Fernandes, 2001; Santos *et al.*, 2011; Rokaya *et al.*, 2016). Com relação a flores, alguns estudos tem demonstrado correlação entre simetria floral e a taxa de transferência de pólen, observando que flores simétricas são frequentemente mais visitadas por abelhas de grande porte, além de verificar que a produção de néctar floral é maior em algumas flores simétricas (Møller, 1995; Møller *et al.*, 1995). Dessa forma, a simetria é uma característica preditiva de qualidade e quantidade de recursos, enquanto a assimetria tende a não ser selecionada pelos visitantes florais devido à menor aptidão apresentada por indivíduos mais assimétricos (Møller *et al.*, 1995; Møller & Swaddle, 1997). Portanto, hipotetizamos uma forte seleção positiva da simetria floral (corola) devido à preferência dos visitantes e conseqüentemente esperamos que os níveis de simetria sejam menores em caracteres não sexuais (folhas) do que em caracteres sexuais (flores). Adicionalmente, hipotetizamos que a disponibilidade dos recursos florais seja diretamente relacionada a simetria floral e conseqüentemente isso seja um indicativo aos visitantes, otimizando o comportamento de visitação seletivo dos visitantes pelas flores.

Material e métodos

Área e espécies estudadas

As coletas de campo foram feitas entre março de 2013 e abril de 2014 na área de cerrado *sensu stricto* da Reserva Ecológica do Clube de Caça e Pesca Itororó de Uberlândia (CCPIU), Minas Gerais, Brasil. A reserva está localizada em 18°59'S e 48°18'O, ao Sul do centro urbano do município de Uberlândia e possui elevação média de 860 metros e uma área total de aproximadamente 640 hectares. A vegetação é composta de diversas fitofisionomias de cerrado: vereda, campo limpo, campo sujo,

cerrado *sensu stricto* e cerrado (Veja em: Réu *et al.*, 2005). A precipitação e temperatura (médias mensais) variam entre 0 e 360 mm e 20 e 25,5°C, respectivamente (Veja mais em: VELASQUE & DEL-CLARO, 2016).

Estudamos duas espécies da família Malpighiaceae, encontradas naturalmente na área de cerrado *sensu stricto* (Gottsberger & Silberbauer-Gottsberger, 2006): *Banisteriopsis campestris* (A. Juss.) Little, que possui flores róseas de cor pouco intensa e *B. malifolia* (Nees & Mart.) B. Gates, cujas flores róseas variam quanto a saturação da coloração (Ferreira & Torezan-Silingardi, 2013). Ambas espécies estão distribuídas ao longo do território brasileiro (Mamede *et al.*, 2014) e possuem floração sequencial com pequena ou média sobreposição dos eventos de floração que acontecem de dezembro a março para *B. campestris* e março a maio para *B. malifolia* (Ferreira & Torezan-Silingardi, 2013; Vilela *et al.*, 2014). Ambas espécies possuem flores com oito elaióforos, no entanto podem ser encontradas na população uma baixa frequência flores com número de elaióforos variando de cinco a dez (Barônio & Torezan-Silingardi, 2016).

Simetria de característica reprodutivas e não reprodutivas

A fim de verificar quais os níveis de simetria floral e foliar, foram coletados dados de caracteres reprodutivos (flores) e não reprodutivos (folhas) para 60 flores e 60 folhas de cada espécie (três unidades de 20 indivíduos). As flores e folhas, de ramos previamente ensacados, foram selecionadas ao acaso, no entanto, restringimos a coleta às flores com antese no dia da coleta e folhas totalmente expandidas. Após a individualização das flores e folhas com linha colorida obtivemos através de paquímetro digital as seguintes medidas, para as flores: (D1) o comprimento do eixo médio esquerdo (E) e direito (D); (D2) o comprimento dos lados esquerdo (F) e direito (G) da pétala estandarte a partir de um eixo longitudinal médio e (D3) o comprimento dos segmentos entre o topo da pétala estandarte e as pétalas basais opostas esquerda (X) e direita (Y) (Fig. 1); E para as folhas: medimos a largura

dos lados direito e esquerdo do eixo longitudinal central de cada folha madura mais próxima à cada flor medida.

Com essas medidas nós calculamos os níveis de simetrias floral e foliar de acordo com $|R - L|/[(R + L)/2]$ onde R e L são respectivamente os lados direito e esquerdo dos caracteres (Palmer *et al.*, 2003). Os níveis de simetria entre os caracteres florais e foliares foram comparados com intuito de saber quais deles apresentavam menor simetria. Para isso as diferenças foram testadas com teste T pareado comparando os três níveis de simetria floral (D1, D2 e D3) com o nível de simetria foliar (F1).

Simetria em flores visitadas e não visitadas

Com intuito de saber se há uma escolha visualmente orientada às flores pelas abelhas no momento das visitas, nós observamos 30 aproximações florais em cada espécie de *Banisteriopsis* entre 0800h e 1100h (N=60). Todas as observações foram realizadas em flores ainda não visitadas, previamente ensacadas no dia anterior as observações de modo a manter a simetria natural sem interferências de herbívoros ou outros visitantes. Em cada observação nós identificamos a flor visitada e a flor não visitada mais próxima à primeira e obtivemos as mesmas medidas supracitadas (Fig. 1).

O níveis de simetria floral foram avaliadas de acordo com a fórmula: $|R - L|/[(R + L)/2]$ onde R e L são respectivamente os lados direito e esquerdo para cada uma das medidas (D1, D2 e D3). Esse índice é usado para corrigir o efeito do tamanho dos caracteres nos níveis de simetria (Palmer *et al.*, 2003). Nós utilizamos um teste T pareado para comparar as três medidas dos níveis de simetria entre os grupos de flores visitadas e não visitadas.

Recursos e simetria floral

A fim de verificar se os recursos florais estão relacionados à simetria floral, a quantidade de pólen, a viabilidade polínica e o volume de óleo floral foram quantificadas em 60 flores em 20 indivíduos por espécie (N=120 flores). O óleo foi coletado pela fricção de um microcapilar sobre a cutícula dos elaióforos (Buchmann, 1987) e seu volume foi quantificado de acordo com o volume cilíndrico ocupado pelo óleo dentro do microcapilar. A quantificação do óleo foi realizada apenas em flores com oito elaióforos, devido à maior frequência na população (Barônio et. al., *no prelo*). O pólen foi quantificado e qualificado quanto à sua viabilidade de acordo com o método do Carmim acético (Dafni *et al.*, 2005).

Para saber como são as relações entre os níveis de simetria e os recursos florais, modelamos regressões lineares múltiplas entre as três medidas dos níveis de simetria e cada um dos recursos (pólen e óleo floral), utilizando-os como variáveis resposta a quantidade de pólen, viabilidade polínica e volume de óleo.

Resultados

Simetria de características reprodutivas e não reprodutivas

Nas duas espécies estudadas os níveis de simetria foliar foram menores que a simetria floral, sendo os efeitos maiores em *B. campestris* do que em *B. malifolia* (Tab. 1). Em *B. campestris* a assimetria foliar variou em média de 7,54 mm (D3-F1) até 20,75 mm (D1-F1) vezes mais que a assimetria floral medida nas três medidas observadas (D1, D2 e D3); Em *B. malifolia* esses valores vão de 2,03 mm (D1-F1) até 14,75 mm (D2-F1) vezes (Tab. 1).

Simetria em flores visitadas e não visitadas

A diferença nos níveis de simetria entre flores visitadas e não visitadas foi diferente nas medidas das pétalas estandarte (D2) de *B. campestris* ($t_{(2)} = 2,126$; $gl = 29$; $p = 0,042$), onde flores visitadas tinham as larguras dos lados da pétala estandarte em média 0,002 mm menor que as de flores não visitadas. Nas medidas do comprimento do eixo médio (D1) e o comprimento entre as pétalas basais e o topo da pétala estandarte (D3), tanto em *B. campestris* como em *B. malifolia*, não observamos diferenças entre os grupos de flores visitadas e não visitadas (Tab. 2).

Recursos e simetria floral

A quantidade de recursos florais (óleo e pólen) bem como a qualidade (viabilidade polínica) não exibiu relação com os níveis de simetria floral dos caracteres medidos (D1, D2 e D3) em ambas espécies estudadas (Tab. 3).

Discussão

Os níveis de simetria foliar foram menores que os valores de simetria floral nas duas espécies de Malpighiaceae de acordo com o esperado, o que caracteriza um ajuste mais fino entre os caracteres florais das plantas do que entre os caracteres vegetativos. Além disso, a simetria da pétala estandarte diferiu entre flores visitadas e não visitadas de *B. campestris*, indicando que os visitantes dessa planta selecionam para a primeira visita flores mais simétricas de acordo com a morfologia da pétala estandarte. No entanto, embora fosse esperado que a simetria floral da corola pudesse ser utilizada pelos visitantes como um indicativo de qualidade e quantidade de recursos florais, não observamos essa relação entre quantidade e qualidade de recursos florais disponíveis e os níveis de simetria floral.

As interações entre as espécies de Malpighiaceae e seus polinizadores evidenciam um sistema de polinização especializado e intrínseco às abelhas coletoras de óleo (Vogel, 1974, 1990), que possuem adaptações para a coleta deste recurso e comportamento efetivo para à polinização (Vogel,

1974, 1988; Alves-dos-Santos *et al.*, 2007; Mello *et al.*, 2013). O comportamento das abelhas coletoras de óleo é fortemente conectado à morfologia floral, uma vez que as visitas que incidem em polinização são efetivamente realizadas quando as abelhas utilizam a mandíbula para fixar-se à pétala estandarte e com os dois primeiros pares de pernas entremeio às outras pétalas, fazendo a raspagem dos elaióforos (Vogel, 1974, 1990; Alves-dos-Santos *et al.*, 2007). Desse modo, com a especialização desse sistema, onde a morfologia da pétala estandarte deve permitir resultados eficientes com o encaixe na morfologia e comportamento do polinizador, é esperado que haja elevada integração e estabilidade dos caracteres reprodutivos quando comparados aos vegetativos (Berg, 1960; Barônio *et al.*, 2016). Essa diferenciação na integração dos caracteres reprodutivos e vegetativos foi proposta inicialmente por Berg (1960), onde propôs-se a ideia de um fino ajuste entre a morfologia de flores e seus polinizadores e possível desacoplamento entre morfologia floral e a morfologia vegetativa (Berg, 1960; Ordano *et al.*, 2008; Conner & Lande, 2014).

Com o ajuste nas interações entre abelhas coletoras de óleo e Malpighiaceae (Alves-dos-Santos *et al.*, 2007; Mello *et al.*, 2013) é natural que a simetria floral seja selecionada (Sargent, 2004; Busch & Zachgo, 2009). A simetria floral tem sido correlacionada com a taxa de transferência de pólen (Møller, 1995; Møller *et al.*, 1995), indicando que flores simétricas são frequentemente mais visitadas. Os visitantes florais tem a capacidade de identificar a morfologia da flor e assim associar uma determinada característica a um determinado recurso ou a forma de obtê-lo (Lavery, 1994; Ida & Kudo, 2010; Jersáková *et al.*, 2012b), portanto, é possível que os visitantes florais não reconheçam por si só a simetria, mas sim quando ela está associada a alguma mudança em outras características de interesse do visitante, como por exemplo a pétala estandarte, que mostramos neste estudo.

A morfologia da pétala estandarte possui importância na história evolutiva entre Malpighiaceae e a guilda de abelhas coletoras de óleo, em especial as abelhas da tribo Centridini (Sazima *et al.*, 2009; Mello *et al.*, 2013). Essas abelhas possuem grande porte, não raras e comumente consideradas os principais polinizadoras das flores de óleo (Sigrist & Sazima, 2004; Alves-dos-Santos *et al.*, 2007).

Particularmente, essa associação é devido ao comportamento de Centridini durante a visita floral que consiste em raspar as glândulas de óleo com os membros dianteiros e medianos enquanto se mantém fixa à flor segurando a pétala estandarte com a mandíbula (Fig. 1; Vogel, 1974, 1990). Assim, a pétala estandarte tem a base mais robusta em comparação às outras quatro pétalas (Fig. 1) e deve possuir resistência suficiente para o contato da abelha durante a visita e mesmo com a intrínseca pressão de seleção (Sazima *et al.*, 2009) exercida sobre ela ainda existem variações morfológicas, de modo que possíveis variações sejam exibidas de acordo com a simetria da pétala estandarte. Assim, dada a importância da pétala estandarte para as abelhas coletoras de óleo, a escolha de flores com pétalas estandarte mais vigorosas deve ser um comportamento conservado ao longo da história evolutiva das abelhas coletoras de óleo, consequentemente flores com maior simetria nessas pétalas promovem a manutenção desse comportamento.

Algumas espécies vegetais com menores níveis de simetria floral produzem néctar floral em menor quantidade e qualidade (Møller, 1995; Møller *et al.*, 1995; Møller *et al.*, 2000), nas quais a simetria tende a ser selecionada pelos visitantes florais devido à maior oferta de recursos (Møller & Eriksson, 1995; Møller & Swaddle, 1997). Outras plantas apresentam maior número de sementes produzidas em flores simétricas e também mais sementes abortadas em flores assimétricas (Møller, 1996). Assim, a simetria seria um indicativo para os visitantes que visitam a flores com maior nível de simetria são mais vantajosas devido ao custo-benefício da interação. No entanto, na falta de uma relação entre simetria e a disponibilidade dos recursos florais, e considerando que a preferência por algum sinal floral pode ser rapidamente alterada pelo aprendizado associativo dos visitantes (Fenster *et al.*, 2004; Harder & Barrett, 2006), pressupõe-se que a seleção de flores durante a primeira visita na planta possa ocorrer de acordo com a abundância de flores e seus diferentes níveis de simetria.

Agradecimentos

Os autores são gratos ao Clube de Caça e Pesca Itororó de Uberlândia pela disponibilização da reserva ecológica e pela apoio da equipe profissional. GJB agradece a agência de financiamento Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida durante o período de doutoramento de abril de 2013 até março 2017. KDC agradece ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

Referências Bibliográficas

- Alves-dos-Santos, I., Machado, I.C. & Gaglianone, M.C. (2007) História natural de abelhas coletoras de óleo. *Oecologia Brasiliensis*, **11**, 554–557.
- Alves-Silva, E. & Del-Claro, K. (2016) Herbivory causes increases in leaf spinescence and fluctuating asymmetry as a mechanism of delayed induced resistance in a tropical savanna tree. *Plant Ecology and Evolution*, **149**, 73–80.
- Barônio, G.J., Maciel, A.A., Oliveira, A.C., Kobal, R.O.A.C., Meireles, D.A.L., Brito, V.L.G., *et al.* (2016) Plantas, polinizadores e algumas articulações da biologia da polinização com a teoria ecológica. *Rodriguésia*, **67**, 275–293.
- Barônio, G.J. & Torezan-Silingardi, H.M. (2016) Temporal niche overlap and distinct bee ability to collect floral resources on three species of Brazilian Malpighiaceae. *Apidologie*. (In press).
- Berg, R.L. (1960) The ecological significance of correlation pleiades. *Evolution*, **14**, 171–180.
- Brito, V., Telles, F. & Lunau, K. (2014) Ecologia cognitiva da polinização. In: *Biologia da polinização*. pp. 417–438.
- Buchmann, S.L. (1987) The Ecology of Oil Flowers and their Bees. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **18**, 343–369.
- Busch, A. & Zachgo, S. (2009) Flower symmetry evolution: towards understanding the abominable mystery of angiosperm radiation. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and*

developmental biology, **31**, 1181–90.

- Chittka, L. & Raine, N.E. (2006) Recognition of flowers by pollinators. *Current Opinion in Plant Biology*, **9**, 428–435.
- Conner, J.K. & Lande, R. (2014) Raissa L. Berg's contributions to the study of phenotypic integration, with a professional biographical sketch. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B*, **369**, 1–4.
- Cornelissen, T. & Stiling, P. (2005) Perfect is best: Low leaf fluctuating asymmetry reduces herbivory by leaf miners. *Oecologia*, **142**, 46–56.
- Cornelissen, T. & Stiling, P. (2011) Similar responses of insect herbivores to leaf fluctuating asymmetry. *Arthropod-Plant Interactions*, **5**, 59–69.
- Cornelissen, T.G. & Fernandes, G.W. (2001) Patterns of attack by herbivores on the tropical shrub *Bauhinia brevipes* (Leguminosae): Vigour or chance? *European Journal of Entomology*, **98**, 37–40.
- Dafni, A., Kevan, P.G. & Husband, B.C. (2005) *Practical pollination biology*. Cambridge, Canada.
- Fenster, C.B., Armbruster, W.S., Wilson, P., Dudash, M.R. & Thomson, J.D. (2004) Pollination Syndromes and Floral Specialization. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **35**, 375–403.
- Ferreira, C.A. & Torezan-Silingardi, H.M. (2013) Implications of the floral herbivory on malpighiaceae plant fitness: Visual aspect of the flower affects the attractiveness to pollinators. *Sociobiology*, **60**, 323–328.
- Frey, F.M., Robertson, A. & Bukoski, M. (2003) A method for quantifying rotational symmetry, 785–791.
- Gottsberger, G. & Silberbauer-Gottsberger, I. (2006) *Life in the Cerrado: a South American Tropical Seasonal Vegetation. Vol. I - Origin, Structure, Dynamics and Plant Use*. Germany.
- Graham, J.H., Raz, S., Hel-Or, H. & Nevo, E. (2010) Fluctuating Asymmetry: Methods, Theory, and

Applications. *Symmetry*, **2**, 466–540.

- Gumbert, A. (2000) Color choices by bumble bees (*Bombus terrestris*) innate preferences and generalization after learning. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **48**, 36–43.
- Harder, L.D. & Barrett, S.C. (2006) *Ecology and evolution of flowers*. Oxford University Press, New York.
- Hirota, S.K., Nitta, K., Suyama, Y., Kawakubo, N., Yasumoto, A.A. & Yahara, T. (2013) Pollinator-mediated selection on flower color, flower scent and flower morphology of *Hemerocallis*: Evidence from genotyping individual pollen grains on the stigma. *PLoS One*, **8**.
- Ida, T.Y. & Kudo, G. (2010) Modification of bumblebee behavior by floral color change and implications for pollen transfer in *Weigela middendorffiana*. *Evolutionary Ecology*, **24**, 671–684.
- Jersáková, J., Jürgens, A., Šmilauer, P. & Johnson, S.D. (2012) The evolution of floral mimicry: Identifying traits that visually attract pollinators. *Functional Ecology*, **26**, 1381–1389.
- Laverty, T.M. (1994) Bumble bee learning and flower morphology. *Animal Behaviour*, **47**, 531–545.
- Leonard, A.S. & Masek, P. (2014) Multisensory integration of colors and scents: Insights from bees and flowers. *Journal of Comparative Physiology A*, **200**, 463–474.
- Leonard, A.S. & Papaj, D.R. (2011) “X” marks the spot: The possible benefits of nectar guides to bees and plants. *Functional Ecology*, **25**, 1293–1301.
- Lunau, K., Unseld, K. & Wolter, F. (2009) Visual detection of diminutive floral guides in the bumblebee *Bombus terrestris* and in the honeybee *Apis mellifera*. *Journal of Comparative Physiology A*, **195**, 1121–1130.
- Mamede, M.C.H., Amorim, A.M. & Sebastiani, R. (2014) Malpighiaceae. *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. URL <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB155> [accessed on 2016].
- Markow, T.A. (1994) *Developmental Instability: Its Origins and Evolutionary Implications*. Contemporary Issues in Genetics and Evolution. Springer Netherlands, Dordrecht.

- Mello, M.A.R., Bezerra, E.L.S. & Machado, I.C. (2013) Functional Roles of Centridini Oil Bees and Malpighiaceae Oil Flowers in Biome-wide Pollination Networks. *Biotropica*, **45**, 45–53.
- Møller, A.P. (1996) Developmental stability of flowers, embryoabortion and developmental selection in plants. *Proceedings of Royal Society of London Serie B*, **263**, 53–56.
- Møller, A.P. (1995) Bumblebee preference for symmetrical flowers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**, 2288–2292.
- Møller, A.P. (2000) Developmental stability and pollination. *Oecologia*, **123**, 149–157.
- Møller, A.P. & Eriksson, M. (1995) Pollinator preference for symmetrical flowers and sexual selection in plants. *Oikos*, **73**, 15–22.
- Møller, A.P. & Swaddle, J.P. (1997) *Asymmetry, developmental stability and evolution*. Oxford University Press, Oxford.
- Neal, P.R., Dafni, A., Giurfa, M., Dafni, A. & Giurfa, M. (1998) Floral symmetry and its role in plant-pollinator systems: Terminology, Distribution, and Hypotheses. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **29**, 345–373.
- Ordano, M., Fornoni, J., Boege, K. & Domínguez, C. a. (2008) The adaptive value of phenotypic floral integration. *New Phytologist*, **179**, 1183–1192.
- Palmer, R.A., Strobeck, C. & Paine, A.R. (1986) Fluctuating asymmetry: measurement, analysis and patterns. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **17**, 391–421.
- Palmer, R., Strobeck, C., Palmer, A.R. & Strobeck, C. (2003) Fluctuating Asymmetry Analyses Revisited. *Developmental Instability (DI): Causes and Consequences*, **2001**, 279–319.
- Pellmyr, O. (2002) Pollination by animals. In: *Plant animal interactions: an evolutionary approach* (ed. by Herrera, C.M. & Pellmyr, O.). Blackwell, p. 313.
- Peter, C.I. & Johnson, S.D. (2008) Mimics and magnets: The importance of color and ecological facilitation in floral deception. *Ecology*, **89**, 1583–1595.
- Price, P.W. (1991) The Plant Vigor Hypothesis and Herbivore Attack. *Oikos*, **62**, 244.

- Réu, W.F., Del-Claro, K. & Reu, W.F. (2005) Natural history and biology of *Chlamisus minax* Lacordaire (Chrysomelidae : Chlamisinae). *Neotropical Entomology*, **34**, 357–362.
- Rodríguez, I., Gumbert, A., Ibarra, N.H., Kunze, J. & Giurfa, M. (2004) Symmetry is in the eye of the “beeholder”: innate preference for bilateral symmetry in flower-naive bumblebees. *Naturwissenschaften*, **91**, 374–377.
- Rokaya, M.B., Dostálek, T. & Münzbergová, Z. (2016) Plant-herbivore interactions along elevational gradient: Comparison of field and common garden data. *Acta Oecologica*, **77**, 168–175.
- Santos, J., Tavares, C. & Almeida-Cortez, J. (2011) Plant Vigor Hypothesis refuted: preference-performance linkage of a gall-inducing weevil on small-sized host plant resources. *Brazilian Journal of Biology*, **71**, 65–69.
- Sargent, R.D. (2004) Flora symmetry affects speciation rates in angiosperms. *Proceedings of Royal Society of London Serie B*, **271**, 603–608.
- Savriama, Y. & Klingenberg, C.P. (2011) Beyond bilateral symmetry: geometric morphometric methods for any type of symmetry. *BMC Evolutionary Biology*, **11**, 280.
- Sazima, I., Pinheiro, M. & Sazima, M. (2009) A presumed case of functional convergence between the flowers of *Schizolobium parahyba* (Fabaceae) and species of Malpighiaceae. *Plant Systematics and Evolution*, **281**, 247–250.
- Sigrist, M.R. & Sazima, M. (2004) Pollination and reproductive biology of twelve species of neotropical malpighiaceae: Stigma morphology and its implications for the breeding system. *Annals of Botany*, **94**, 33–41.
- Thompson, J.N. (1994) *The coevolutionary process*. 1st edn. University of Chicago Press, Chicago.
- Thompson, J.N. (2005) *The geographic mosaic of coevolution*. University of Chicago Press, Chicago.
- Torezan-Silingardi, H.M. (2012) Flores e animais: uma introdução à história natural da polinização. In *Ecologia Evolutiva das Interações Plantas-Animais: Uma abordagem ecológico-evolutiva* (ed. by Claro, K. Del & Torezan-Silingardi, H.M.). Technical Books Editora, Rio de Janeiro,

pp. 111–139.

- Varassin, I.G. & Amaral-Neto, L.P. do. (2014) Atrativos. *In: Biologia da polinização*. pp. 151–168.
- Vázquez, D.P., Chacoff, N.P. & Cagnolo, L. (2009) Evaluating multiple determinants of the structure of plant-animal mutualistic networks. *Ecology*, **90**, 2039–2046.
- Velasque, M. & Del-Claro, K. (2016) Host plant phenology may determine the abundance of an ecosystem engineering herbivore in a tropical savanna. *Ecological Entomology*, **41**, 421–430.
- Vilela, A.A., Torezan-Silingardi, H.M. & Claro, K. Del. (2014) Conditional outcomes in ant-plant-herbivore interactions influenced by sequential flowering. *Flora (Jena)*, **209**, 359–366.
- Vogel, S. (1974) Ölblumen und ölsammelnde Bienen. *Tropische und Subtropische Pflanzenwelt*, **7**, 285–547.
- Vogel, S. (1988) The oil-bee oil-flower relationships - parallelism and other aspects of their evolution in space and time. *Zeitschrift Für Zoologische Systematik und Evolutionsforschung*, **26**, 341–362.
- Vogel, S. (1990) History of the malpighiaceae in the light of pollination ecology. *Memoirs of the New York Botanical Garden*, **50**, 130–142.

Figuras

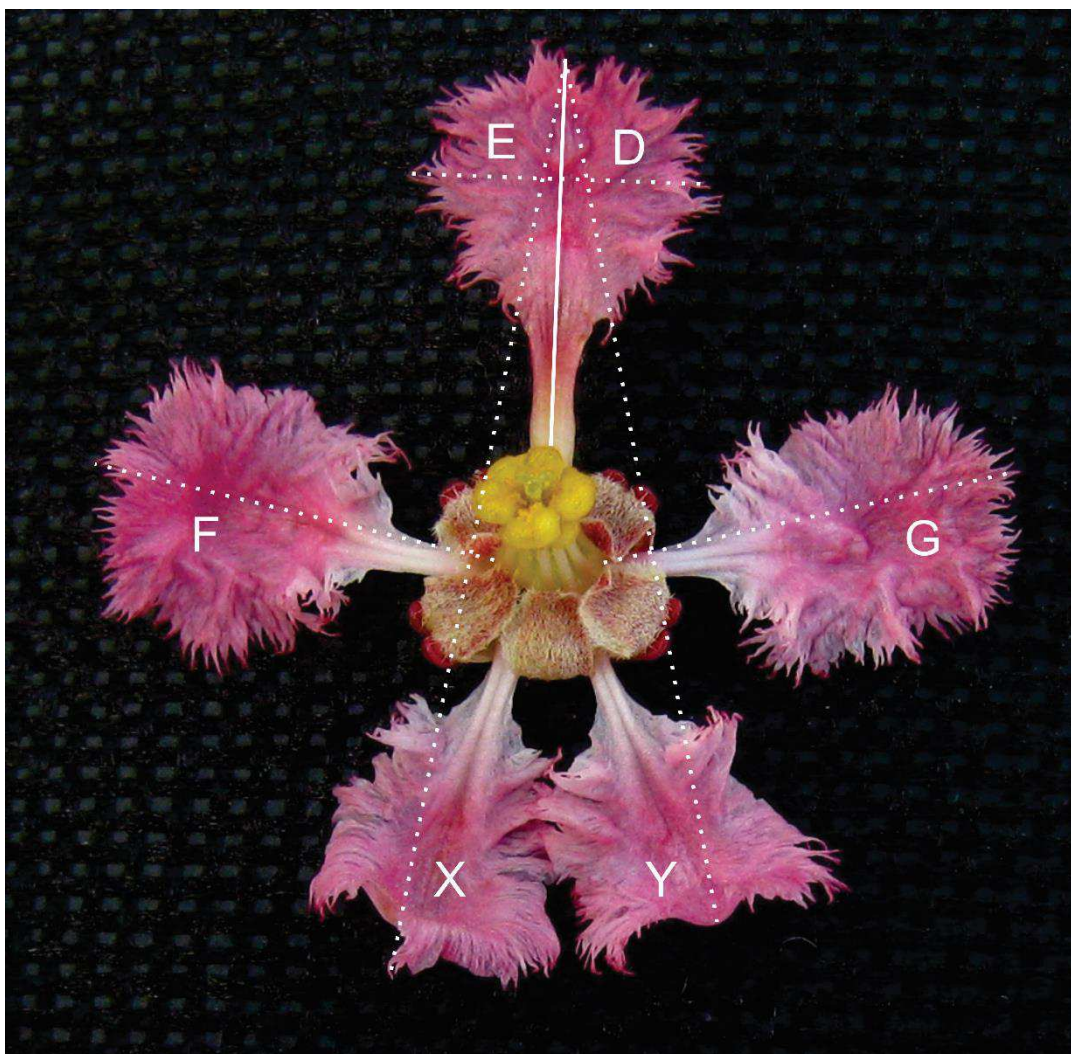


Figura 1. Flor de *Banisteriopsis malifolia* exemplificando todos os caracteres medidos nas pétalas: (D1) o comprimento do eixo médio esquerdo (E) e direito (D); (D2) o comprimento dos lados esquerdo (F) e direito (G) da pétala estandarte a partir de um eixo longitudinal médio e (D3) o comprimento dos segmentos entre o topo da pétala estandarte e as pétalas basais opostas esquerda (X) e direita (Y).



Figura 2. *Banisteriopsis malifolia* sendo visitada por um indivíduo de *Centris* sp. (Centridini). A visita é adequada à polinização quando ocorre a fixação da mandíbula na base da pétala estandarte e a raspagem das glândulas de óleo com os dois primeiros pares de pernas.

Tabelas

Tabela 1. Diferenças nos níveis de simetria médios observados em caracteres vegetativos e reprodutivos de duas espécies de Malpighiaceae (*B. campestris* e *B. malifolia*) coletadas no cerrado do sudoeste brasileiro (Uberlândia – MG).

Espécies	Comparação entre caracteres	Nível de simetria floral média (mm)	Nível de simetria foliar média (mm)	<i>t</i>	<i>g.l.</i>	Valor <i>p</i>
<i>B. campestris</i>	D1 - F1	0,004±0,0004		43,647	59	<0,0001
	D2 - F1	0,007±0,0006	0,083±0,002	41,641	59	<0,0001
	D3 - F1	0,011±0,001		32,722	59	<0,0001
<i>B. malifolia</i>	D1 - F1	0,026±0,002		3,182	59	0,002
	D2 - F1	0,004±0,0004	0,059±0,01	5,612	59	<0,0001
	D3 - F1	0,009±0,001		5,876	59	<0,0001

Tabela 2. Diferenças nos níveis de simetria médios observados em flores visitadas e não visitadas durante a primeira aproximação dos visitantes florais em duas espécies de Malpighiaceae (*B. campestris* e *B. malifolia*) coletadas no cerrado do sudoeste brasileiro (Uberlândia – MG).

Espécie	Caracteres	Simetria da flor visitada	Simetria da flor não visitada	<i>t</i>	<i>g.l</i>	Valor <i>p</i>
<i>B. malifolia</i>	D1	0,029±0,002	0,028±0,004	0,117	29	0,907
	D2	0,005±0,0007	0,004±0,0004	0,986	29	0,332
	D3	0,011±0,002	0,007±0,001	1,059	29	0,298
<i>B. campestris</i>	D1	0,004±0,0006	0,006±0,0008	2,126	29	0,042*
	D2	0,018±0,003	0,015±0,002	0,85	29	0,402
	D3	0,0130±0,002	0,014±0,002	0,372	29	0,713

Tabela 3. Modelos múltiplos da relação entre os níveis de simetria (D1, D2 e D3) e a quantidade (óleo e pólen) e qualidade (viabilidade do pólen) dos recursos florais de duas espécies de Malpighiaceae (*B. campestris* e *B. malifolia*) coletadas no cerrado do sudoeste brasileiro (Uberlândia – MG).

Espécie	Recursos	R ²	F	g.l.	Valor P
<i>B. campestris</i>	Pólen	0,05	0,902	3; 56	0,445
	Óleo	0,04	0,877	3; 56	0,458
	Viabilidade pólen	0,03	0,574	3; 56	0,645
<i>B. malifolia</i>	Pólen	0,03	0,65	3; 56	0,587
	Óleo	0,03	0,506	3; 56	0,68
	Viabilidade pólen	0,02	0,497	3; 56	0,685

Considerações finais

Este estudo mostrou que a densidade de formigas é uma importante característica preditora das interações planta polinizador. Inevitavelmente, o estudo dessas interações se direciona para um patamar onde as interações não são mais definidas pela simples presença ou ausência das formigas, mas sim pela densidade de formigas que pode induzir a diferentes cenários resultante da interação entre plantas e polinizadores. Além disso, a morfologia floral mostra-se não menos importante que outros fatores, uma vez que características fortemente selecionadas pelo desenvolvimento evolutivos das interações, como a pétala estandarte, ainda apresenta-se como característica morfológicamente selecionada pelo polinizadores para a a visitação floral de plantas que disponibilizam óleo floral.

No capítulo 1, vimos que a interação entre formigas e planta está ligada à interação entre planta e visitante floral por mecanismos próprios, como: a atividade sazonal dos nectários extraflorais, que se sobrepõe temporalmente à floração e a localização periféricas deles, que fornecem recursos açucarados às formigas. Desse modo, a formigas são estimuladas a forragear próximo às flores, o que permite a interação indireta com os visitantes e causa efeitos secundários. Dentre esses efeitos secundários, observamos que a presença de formigas causa redução nas visitas de abelhas de pequeno porte com consequente redução na sobreposição de nicho temporal dos visitantes de de grande porte em *B. campestris*. De modo geral, o efeito das formigas na aptidão reprodutiva das plantas é negativo, entretanto, quando em densidade intermediária de formigas, a frutificação e a duração das visitas parecem ser beneficiadas com pequenos e variáveis acréscimos na aptidão das plantas. Assim, as formigas possuem efeitos variáveis tanto na interação com os visitantes florais como na aptidão reprodutiva das plantas, onde a densidade de formigas seria um fator decisivo para a manutenção das interações sem grandes déficits com prejuízo para algum dos interagentes.

No capítulo 2, vimos como é a relação das plantas e visitantes de acordo com aspectos cognitivos dos visitantes a respeito da simetria das flores e a disponibilidade de recursos, nesse caso pólen e óleo floral. Observamos maior simetria de características reprodutivas em relação às

vegetativas. Além disso, maiores níveis de simetria não indicaram flores com maior qualidade e quantidade de recursos, como óleo e pólen. No entanto, nosso estudo reforça a importância da pétala estandarte para os visitantes, uma vez que sua morfologia parece influenciar a decisão de visitar ou não a flor, pois houve diferença na simetria da pétala estandarte entre as flores visitadas e não visitadas durante a aproximação das abelhas.

Este estudo das interações entre Malpighiaceae, abelhas coletoras de óleo e formigas permitiu entender melhor algumas particularidades do sistema, como a influência presença de formigas, mediada pela presença de nectários extraflorais. Sabendo que existem efeitos das formigas sobre a visitação das flores, mas que tornam-se variáveis de acordo com a densidade desses insetos. Assim, reforçamos com nossos resultados que as interações entre formigas e plantas são delineadores das interações entre plantas e visitantes florais.