



Universidade Federal de Uberlândia

Instituto de Biologia



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

**INFLUÊNCIA DE FATORES BIÓTICOS E ABIÓTICOS NO
CRESCIMENTO E REPRODUÇÃO DA MIRMECÓFITA *MICONIA
TOCOCA* (Desr.) Michelang. (MELASTOMATACEAE)**

Helen Carla Belan

2020

Helen Carla Belan

**INFLUÊNCIA DE FATORES BIÓTICOS E ABIÓTICOS NO
CRESCIMENTO E REPRODUÇÃO DA MIRMECÓFITA *MICONIA*
TOCOCA (Desr.) Michelang. (MELASTOMATACEAE)**

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

Orientador

Prof. Dr. Heraldo L. Vasconcelos

UBERLÂNDIA

Junho – 2020

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

B426 Belan, Helen Carla, 1991-
2020 Influência de fatores bióticos e abióticos no crescimento e
reprodução da mirmecófita Miconia tococa (Desr.) Michelang.
(Melastomataceae) [recurso eletrônico] / Helen Carla Belan. -
2020.

Orientador: Heraldo Luis de Vasconcelos.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-
graduação em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2020.458>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Ecologia. I. Vasconcelos, Heraldo Luis de, 1963-, (Orient.). II.
Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Ecologia e
Conservação de Recursos Naturais. III. Título.

CDU: 574

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais

Av. Pará, 1720, Bloco 2D, Sala 26 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38405-320
Telefone: (34) 3225-8641 - www.ppgeco.ib.ufu.br - ecologia@umuarama.ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Ecologia e Conservação de Recursos Naturais			
Defesa de:	Tese, número 70, COPEC			
Data:	vinte e quatro de junho de dois mil e vinte	Hora de início:	13:30	Hora de encerramento:
Matrícula do Discente:	11613ECR002			
Nome do Discente:	Helen Carla Belan			
Título do Trabalho:	Influência de fatores bióticos e abióticos no crescimento e reprodução da mirmecófita Miconia tococa (Desr.) Michelang. (Melastomataceae)			
Área de concentração:	Ecologia			
Linha de pesquisa:	Ecologia comportamental e de interações			
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Fatores responsáveis pela persistência de populações da mirmecófita Tococa guianensis na ausência de associações mutualísticas com formigas			

Reuniu-se por webconferência a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais, assim composta pelos Doutores: Emilio Miguel Bruna - University of Florida; Ricardo Ildefonso de Campos - Universidade Federal de Viçosa; Diego Vinicius Anjos Silva - Universidade Federal de Uberlândia; Talita Câmara dos Santos Bezerra - Universidade Federal de Uberlândia; Heraldo Luis de Vasconcelos - Universidade Federal de Uberlândia, orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr(a). Heraldo Luis de Vasconcelos, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a participação de todos e concedeu ao(à) Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do(a) Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(as) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado(a).

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Heraldo Luis de Vasconcelos, Professor(a) do Magistério Superior**, em 24/06/2020, às 17:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Emilio Miguel Bruna, Usuário Externo**, em 24/06/2020, às 17:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Talita Câmara dos Santos Bezerra, Usuário Externo**, em 24/06/2020, às 17:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Diego Vinícius Anjos Silva, Usuário Externo**, em 24/06/2020, às 17:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Ildefonso de Campos, Usuário Externo**, em 24/06/2020, às 17:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2075187** e o código CRC **37B7CB9B**.

Helen Carla Belan

**INFLUÊNCIA DE FATORES BIÓTICOS E ABIÓTICOS NO CRESCIMENTO E
REPRODUÇÃO DA MIRMECÓFITA *MICONIA TOCOCA* (Desr.) Michelang.
(MELASTOMATACEAE)**

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

Prof. Dr. Emilio M. Bruna – University of Florida _____

Prof. Dr. Ricardo I. Campos – Universidade Federal de Viçosa _____

Dr. Diego V. Anjos Silva – Universidade Federal de Uberlândia _____

Profa. Dra. Talita C. S. Bezerra – Universidade Federal de Uberlândia _____

Prof. Dr. Heraldo L. Vasconcelos
Universidade Federal de Uberlândia
(Orientador)

UBERLÂNDIA

Junho – 2020

Dedico esse trabalho ao meu pai
Gilmar (*in memoriam*), com todo
o meu amor e gratidão.

“What we know is a drop, what we ignore is
an ocean.”— Isaac Newton

Agradecimentos

Agradeço a Deus, pelas oportunidades recebidas e pelo encerramento de mais um ciclo na minha vida.

Aos meus pais, Gilmar e Alzira, pela dedicação incondicional sem a qual nada disso seria possível. Pelo apoio financeiro, emocional e até de campo. Em especial, ao meu pai Gilmar, que mesmo em seus momentos mais difíceis me transformou como ser humano e me ensinou a valorizar cada passo da jornada. Sempre vou te amar.

Aos meus irmãos, Henri e Helder, por serem meus exemplos e minha base. As minhas cunhadas, Andressa e Aline, pelo apoio em todos os momentos. Aos meus sobrinhos, Matheus, Antônio, Lucca e Lisa, por trazerem alegria e leveza aos meus dias.

Ao meu orientador Heraldo Vasconcelos, pela orientação e pelos conhecimentos compartilhados.

Aos professores, Denis Coelho, Ana Silvia Moreira, e Vinicius Kuster, pela parceria de trabalho desenvolvida ao longo desses quatro anos.

Ao meu amigo Gudryan Barônio, pela parceria acadêmica e pela amizade desde a época do mestrado.

A minha amiga Raquel, pelo companheirismo, pela troca de experiências e por ter mudado minha visão de vida e de morte.

A Fernanda, pela ajuda essencial que me deu em campo.

Aos amigos do LEIS, Karen, Jésica, Renata, Thaynah, Lino e Jonas, pelas ajudas no campo, pelas conversas e pelos happy hour, importantíssimos para a conclusão desse doutorado.

Ao seu Zideone e a dona Zélia, por sempre me acolherem em Jataí.

Às secretárias do programa, Maria Angélica e Juliana, pela disposição e pelo suporte, desde o momento da minha inscrição até o momento da defesa.

À Universidade Federal de Uberlândia e ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais, pela estrutura e pela oportunidade de realizar o doutorado.

À CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado que tornou esse projeto viável.

Aos membros da banca, por terem aceitado o convite, e, desde já, pelas contribuições que serão feitas a esse trabalho.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para que esse trabalho fosse concluído.

ÍNDICE

RESUMO	9
ABSTRACT	10
Introdução geral.....	11
Capítulo 1 - Importância relativa do mutualismo trófico e da proteção contra herbivoria na interação entre <i>Miconia tococa</i> e <i>Allomerus octoarticulatus</i>.....	19
Resumo	19
Introdução	20
Material e métodos.....	22
Área de estudo.....	22
Obtenção das plântulas	22
Desenho amostral.....	23
Medições	24
Análise de isótopos estáveis.....	25
Análise de dados	26
Resultados.....	26
Discussão.....	28
Referências.....	31
Capítulo 2 - Extranuptial nectaries in flowers: ants increase the reproductive success of the ant-plant <i>Miconia tococa</i> (Melastomataceae)*	36
Abstract.....	36
Introduction.....	37
Materials and methods	39
Study sites	39
Study species.....	39
Structure of the extranuptial nectary and its resource production	40
Floral visitors	40
Ant exclusion experiment	41
Results	42
Structure of the extranuptial nectary and its resource production	42
Floral visitors	44
Ant exclusion experiment	47
Discussion.....	48
Structure of the extranuptial nectary and its resource production	49
Floral visitors	50
Ant exclusion experiment	50
Acknowledgements	52
References	52

Supporting Information	59
Capítulo 3 - Variações morfológicas, fisiológicas e reprodutivas da mirmecófita <i>Miconia tococa</i> em ambientes com diferentes condições de luminosidade.....	61
Resumo.....	61
Introdução	63
Material e métodos.....	66
Locais de estudo.....	66
Características morfológicas e fisiológicas.....	68
Experimento de palatabilidade.....	69
Tamanho das plantas, herbivoria e investimento reprodutivo	70
Resultados.....	72
Características morfológicas.....	72
Características fisiológicas.....	73
Experimento de palatabilidade.....	75
Tamanho das plantas, herbivoria e investimento reprodutivo	75
Discussão.....	78
Características morfológicas.....	79
Características fisiológicas.....	81
Experimento de palatabilidade.....	82
Tamanho das plantas, herbivoria e investimento reprodutivo	83
Conclusão.....	84
Referências.....	84
Considerações finais.....	91

RESUMO

Belan, H.C. 2020. Influência de fatores bióticos e abióticos no crescimento e reprodução da mirmecófita *Miconia tococa* (Desr.) Michelang. (Melastomataceae). Tese de doutorado em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais. UFU. Uberlândia-MG. 89p

Mirmecófitas são plantas que apresentam estruturas especializadas que funcionam como abrigo e local de nidificação para formigas mutualistas, a exemplo de domáceas e caules ocos. Além de refúgio, essas plantas também podem fornecer alguma fonte de alimento, como néctar extrafloral. Em troca desses benefícios, as formigas oferecem proteção contra herbívoros e patógenos e podem auxiliar na nutrição vegetal. Diversos fatores bióticos e abióticos podem afetar esse mutualismo planta-formiga e o desenvolvimento dos organismos envolvidos. Eu avaliei o efeito de alguns desses fatores no crescimento e reprodução da mirmecófita *Miconia tococa* (Melastomataceae). No primeiro capítulo, avaliei experimentalmente a importância relativa do mutualismo trófico e da proteção contra herbivoria na interação entre *M. tococa* e a formiga *Allomerus octoarticulatus*. Plântulas de *M. tococa* foram submetidas a cinco tratamentos: (i) colonização por *A. octoarticulatus*, (ii) protegidas contra herbívoros, (iii) protegidas contra herbívoros e com adição de fertilizante, (iv) com adição de fertilizante e (v) controle. Plantas colonizadas e plantas protegidas cresceram mais do que plantas submetidas ao tratamento controle ou apenas fertilizadas artificialmente, demonstrando que a proteção contra inimigos naturais é mais importante para o desenvolvimento da planta hospedeira do que o aporte nutricional fornecido pelas formigas. No segundo capítulo, avaliei se a presença de formigas oportunistas nos órgãos reprodutivos de *M. tococa* afeta a reprodução sexuada de sua hospedeira. Por meio de análises anatômicas, constatei a presença de uma epiderme repleta de tricomas glandulares que produzem néctar extrafloral nas pétalas de *M. tococa*. A produção de néctar ocorreu na fase de botão floral, sendo que 17 espécies de formigas forragearam nesses botões sem que a atividade de polinizadores fosse interferida. Além disso, demonstrei experimentalmente que a presença de formigas nas inflorescências aumentou em 15% a proporção de botões florais que geraram frutos. No terceiro capítulo, investiguei como *M. tococa* se adapta a ambientes com diferentes condições abióticas. Para tal, avaliei características morfológicas e fisiológicas, além da palatabilidade, crescimento e reprodução de indivíduos de *M. tococa* naturalmente presentes em ambientes com diferentes níveis de luminosidade: interior e borda de mata de galeria. Plantas em borda de mata tiveram folhas com maior dureza, maior densidade de tricomas na face inferior, e menor palatabilidade do que as plantas de interior da mata. Na ausência de interações com formigas obrigatórias, plantas em borda de mata mostraram metabolismo mais ativo e maior produção de fotoassimilados, o que resultou em maior número de inflorescências em relação a plantas de interior da mata. Já na presença de interações com formigas obrigatórias, a quantidade de luz não afetou o desempenho das plantas, o que indica que a interação mutualista reduz a vulnerabilidade das plantas às variações nas condições abióticas do meio. De modo geral, mostrei que fatores bióticos, como a presença de formigas mutualistas, e fatores abióticos, como a intensidade luminosa, afetam o desenvolvimento da mirmecófita *M. tococa*, e que a associação sinergética entre esses fatores pode alterar o resultado da interação mutualista.

Palavras-chave: *Tococa guianensis*, mutualismo, herbivoria, mirmecotrofia, formigas, luz

ABSTRACT

Belan, H.C. 2020. Influence of biotic and abiotic factors on the growth and reproduction of the ant-plant *Miconia tococa* (Desr.) Michelang. (Melastomataceae). Tese de doutorado em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais. UFU. Uberlândia-MG. 89p

Ant-plants, or myrmecophytes, have specialized structures that provide shelter to ants, such as domatia and hollow stems. Besides sheltering, these plants can also provide food resources in the form of extrafloral nectar. In exchange for these benefits, ants offer protection against herbivores and pathogens and can aid in plant nutrition. Several biotic and abiotic factors can affect this mutualism and the development of the organisms involved. I evaluated the effect of biotic and abiotic factors on the growth and reproduction of the myrmecophyte *Miconia tococa* (Melastomataceae). In the first chapter, I performed experiments to assess the relative importance of trophic mutualism and protection against herbivory in the interaction between *M. tococa* and the ant *Allomerus octoarticulatus*. Seedlings of *M. tococa* were subject to five treatments: (i) colonization by *A. octoarticulatus*, (ii) protection against herbivores, (iii) protection against herbivores and with fertilizer addition, (iv) fertilizer addition only, and (v) control. Both colonized plants and protected plants grew more than control plants or those submitted to artificially fertilized treatment, which indicates that protection against natural enemies is more important for the plant development than the nutritional support provided by ants. In the second chapter, I evaluated whether the presence of opportunistic ants in the reproductive structures of *M. tococa* affects its reproductive output. In inspecting anatomical traits, I found an epidermis filled with glandular trichomes that produce extrafloral nectar on *M. tococa* petals. The production of nectar occurred in the floral bud stage, and at least 17 ant species foraged on these buds without interfering with pollinator activity. Moreover, I used experiments to demonstrate that the presence of ants in the inflorescences increased the proportion of floral buds producing fruits by 15%. In the third chapter, I investigated how *M. tococa* respond to environments under different abiotic conditions. I assessed morphological and physiological traits, in addition to the palatability, growth, and reproduction of *M. tococa* individuals naturally present in environments with two levels of light: interior and edge of gallery forest. Plants in the forest edge had leaves with greater toughness, higher trichome density on the abaxial surface, and lower palatability than plants in the forest interior. In the absence of interactions with obligate ants, plants at the forest edge showed more active metabolism and greater production of photoassimilates, which resulted in a greater number of inflorescences relative to plants in the interior forest. In the presence of interactions with obligate ants, the environmental lightness did not affect plants reproductive output, which indicates that the mutualistic interaction reduces the vulnerability of the plants to variations in the abiotic conditions. Overall, I showed that biotic factors such as the presence of mutualistic ants, and abiotic factors as light intensity, both affect the development of the myrmecophyte *M. tococa*, and that the synergistic association among these different factors can affect the outcome of mutualistic interactions.

Keywords: *Tococa guianensis*, mutualism, herbivory, myrmecotrophy, ants, light

Introdução geral

Dentro de uma comunidade, os organismos podem interagir entre si e com o meio de diversas maneiras. Sendo que, dependendo dos efeitos dessas interações, elas podem ser positivas, negativas ou neutras para os indivíduos. A interação é negativa nos casos em que pelo menos um dos organismos envolvidos tem seu crescimento, desenvolvimento ou fitness prejudicado. Por outro lado, interações positivas devem beneficiar ao menos uma das partes envolvidas, sem trazer prejuízos para a outra (Agrawal *et al.* 2007; Chamberlain & Holland 2009). O mutualismo entre plantas mirmecófitas e algumas espécies de formigas é um caso bem conhecido de interação positiva em que os dois organismos envolvidos são beneficiados (Heil & McKey 2003). Essas plantas apresentam estruturas especializadas, conhecidas como domáceas, que funcionam como abrigo e local de nidificação para as formigas. Além dessa proteção, as plantas hospedeiras podem fornecer alguma fonte de alimento para as formigas, como o néctar extrafloral (Mayer *et al.* 2014). Em troca desses benefícios, as formigas oferecem proteção contra herbívoros e patógenos e, ainda, descobertas mais recentes tem demonstrado que as formigas podem auxiliar na nutrição vegetal (Fischer *et al.* 2003; Trager *et al.* 2010).

A proteção contra herbívoros já foi experimentalmente testada para diversas associações entre mirmecófitas e formigas, assim, estudos mostraram que a retirada das colônias afetou negativamente as plantas pelo aumento da herbivoria (Vasconcelos 1991; Alvarez *et al.* 2001). Os estudos sobre mutualismo trófico são mais recentes e envolvem o uso de elementos radioativos e isótopos estáveis, que permitem observar o fluxo de nutrientes provenientes das formigas e incorporados pelas plantas (Cabrera & Jaffe 1994; Fischer *et al.* 2003; Gonçalves *et al.* 2016). Esse fluxo só é possível porque as estruturas das plantas que abrigam as formigas também são capazes de absorver a matéria orgânica depositada, seja pelos restos de alimento, defecação, ou pela própria morte das formigas (Fischer *et al.* 2003; Solano & Dejean 2004).

Apesar das vantagens fornecidas pelas duas partes envolvidas na interação, é comum haver conflitos entre os parceiros mutualistas. O crescimento das colônias depende diretamente da quantidade de espaços disponíveis para nidificação (domáceas), assim, o recurso energético expendido pelas plantas para formação de estruturas reprodutivas ao invés de estruturas vegetativas não é interessante para o desenvolvimento das formigas (Yu & Pierce 1998; Fonseca 1999). Em casos extremos de conflito, as formigas, embora efetivas na proteção contra os herbívoros foliares, também podem castrar a planta hospedeira ao danificar as flores ou repelir os polinizadores (Yu & Pierce 1998; Izzo & Vasconcelos 2002; Gaume *et al.* 2005; Malé *et al.* 2012). Diante disso, várias plantas mirmecófitas apresentam estratégias para evitar a presença dos parceiros mutualistas em seus órgãos reprodutivos, como o aborto de domáceas dos ramos reprodutivos (Izzo & Vasconcelos 2002), segregações temporais e espaciais para prevenir as interações formiga-polinizador (Gaume *et al.* 2005; Malé *et al.* 2015), ou ainda a produção de voláteis repelentes de formigas em flores jovens (Willmer & Stone 1997).

Todos os custos e os benefícios envolvidos na interação mutualista determinam o estabelecimento e o sucesso reprodutivo dos organismos envolvidos, e isso pode ser alterado conforme as condições abióticas do meio, já que essas também podem afetar o desenvolvimento de cada organismo (Yamawo & Hada 2010; Hoeksema & Bruna 2015; Jones *et al.* 2017). Para plantas, as mudanças em características físicas e químicas do ambiente podem gerar modificações anatômicas e fisiológicas, e até determinar o seu potencial reprodutivo (Souza *et al.* 2018; Poorter *et al.* 2019). Um dos fatores abióticos que mais influenciam a sobrevivência e o crescimento das plantas é a luz, pois afeta diretamente a taxa de trocas gasosas e a síntese de fotoassimilados (Valladares & Niinemets 2008). Desta forma, todas as plantas apresentam certa capacidade de adaptação a distintos níveis de luminosidade por meio de variações morfológicas, fisiológicas e estruturais (Bloor & Grubb 2004; Rozendaal *et al.* 2006; Cai *et al.* 2008). Como as folhas são os órgãos fotossintéticos mais importantes, a modificação foliar é a forma mais eficiente de aclimatação e aproveitamento da

luz em determinado ambiente (Rozendaal *et al.* 2006). Variações na área e massa foliar, na concentração de clorofilas e carotenoides e na quantidade de tricomas podem potencializar a captura de luz ou minimizar os danos causados pelo excesso de luminosidade (Gratani *et al.* 2006; Poorter *et al.* 2009; Xiao *et al.* 2017). Apesar das espécies e dos indivíduos diferirem no grau de adaptabilidade, de modo geral, o aumento de luminosidade gera um aumento do potencial fotossintético, o que leva a um aumento do crescimento vegetativo e, consequentemente, do esforço reprodutivo (Poorter *et al.* 2019).

Tendo em vista que as interações bióticas e as variações ambientais podem afetar o desenvolvimento e a manutenção dos organismos, *Miconia tococa* (Desr.) Michelang. (previamente *Tococa guianensis*, Melastomataceae) é uma mirmecófita que pode ser usada como um interessante modelo para avaliar esses efeitos. Essa espécie possui uma ampla distribuição geográfica, que vai desde o sul do México até a região sudeste do Brasil, apresentando variações morfológicas entre as populações, e ocorrendo em ambientes com condições abióticas diferentes dentro de uma mesma localidade, como sub-bosque de matas úmidas, borda de mata e veredas (Michelangeli 2003, 2005). Além disso, *M. tococa* também apresenta interações de mutualismo com formigas ao longo de sua distribuição. A grande maioria das populações de *M. tococa* é habitada por formigas obrigatórias, ou seja, que nidificam apenas em mirmecófitas, como formigas dos gêneros *Azteca*, *Crematogaster* e *Allomerus*, que protegem sua hospedeira contra herbívoros (Bizerril & Vieira 2002; Michelangeli 2003; Moraes & Vasconcelos 2009). Entretanto, populações no limite sul da distribuição, onde uma parte do presente estudo foi desenvolvida, são associadas apenas a formigas não-obrigatórias, cuja associação é apenas facultativa e não é estabelecido um mutualismo protetivo efetivo (Moraes & Vasconcelos 2009). Apesar dos estudos desenvolvidos, pouco se sabe sobre os fatores que permitem a manutenção dessas populações sem um parceiro mutualista obrigatório (Moraes & Vasconcelos 2009; Bartimachi *et al.* 2015).

Buscando avaliar os efeitos dos fatores bióticos e abióticos no crescimento e na reprodução da mirmecófita *M. tococa*, a presente tese foi dividida em três capítulos:

- (1) Importância relativa do mutualismo trófico e da proteção contra herbivoria na interação entre *Miconia tococa* e *Allomerus octoarticulatus*;
- (2) Nectário extrafloral nas flores: formigas oportunistas aumentam o sucesso reprodutivo da mirmecófita *Miconia tococa* (Melastomataceae);
- (3) Variações morfológicas, fisiológicas e reprodutivas da mirmecófita *Miconia tococa* em ambientes com diferentes condições de luminosidade.

Referências

- Agrawal A.A., Ackerly D.D., Adler F., Arnold A.E., Cáceres C., Doak D.F., Post E., Hudson P.J., Maron J., Mooney K.A., Power M., Schemske D., Stachowicz J., Strauss S., Turner M.G., Werner E. (2007) Filling key gaps in population and community ecology. *Frontiers in Ecology and the Environment* **5**:145–152. [https://doi.org/10.1890/1540-9295\(2007\)5\[145:FKGIPA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1540-9295(2007)5[145:FKGIPA]2.0.CO;2)
- Alvarez G., Armbrecht I., Jiménez E., Armbrecht H., Ulloa-chacon P. (2001) Ant-plant association in two *Tococa* species from a primary Rain Forest of Colombian Choco (Hymenoptera:Formicidae). *Sociobiology* **38**:585–602.
- Bartimachi A., Neves J., Vasconcelos H.L. (2015) Geographic variation in the protective effects of ants and trichomes in a Neotropical ant-plant. *Plant Ecology* **216**:1083–1090. <https://doi.org/10.1007/s11258-015-0491-7>
- Bizerril M.X.A., Vieira E.M. (2002) *Azteca* ants as antiherbivore agents of *Tococa formicaria* (Melastomataceae) in Brazilian Cerrado. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* **37**:145–149. <https://doi.org/10.1076/snfe.37.2.145.8585>
- Bloor J.M.G., Grubb P.J. (2004) Morphological plasticity of shade-tolerant tropical rainforest tree seedlings exposed to light changes. *Functional Ecology* **18**:337–348. <https://doi.org/10.1111/j.0269-8463.2004.00831.x>
- Cabrera M., Jaffe K. (1994) A trophic mutualism between the myrmecophytic Melastomataceae *Tococa guianensis* Aublet and an *Azteca* ant species. *Ecotropicos* **7**:1–10.
- Cai Z.Q., Poorter L., Han Q., Bongers F. (2008) Effects of light and nutrients on seedlings of tropical *Bauhinia* lianas and trees. *Tree Physiology* **28**:1277–1285. <https://doi.org/10.1093/treephys/28.8.1277>
- Chamberlain S.A., Holland J.N. (2009) Quantitative synthesis of context dependency in ant-plant protection mutualisms. *Ecology* **90**:2384–2392. <https://doi.org/10.1890/08-1490.1>
- Fischer R.C., Wanek W., Richter A., Mayer V. (2003) Do ants feed plants? A ¹⁵N labelling study of nitrogen fluxes from ants to plants in the mutualism of *Pheidole* and *Piper*. *Journal of Ecology* **91**:126–134. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2745.2003.00747.x>
- Fonseca C.R. (1999) Amazonian ant-plant interactions and the nesting space limitation hypothesis. *Journal of Tropical Ecology* **15**:807–825. <https://doi.org/10.1017/S0266467499001194>

Gaume L., Zacharias M., Borges R.M. (2005) Ant-plant conflicts and a novel case of castration parasitism in a myrmecophyte. *Evolutionary Ecology Research* **7**:435–452.
<https://doi.org/10.1002/pro.2338>

Gonçalves A.Z., Oliveira R.S., Oliveira P.S., Romero G.Q. (2016) Species-Specific effects of ant inhabitants on bromeliad nutrition. *PLoS ONE* **11**:1–12.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152113>

Gratani L., Covone F., Larcher W. (2006) Leaf plasticity in response to light of three evergreen species of the Mediterranean maquis. *Trees - Structure and Function* **20**:549–558.
<https://doi.org/10.1007/s00468-006-0070-6>

Heil M., McKey D. (2003) Protective ant-plant interactions as model systems in ecological and evolutionary research. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **34**:425–553.
<https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132410>

Hoeksema J.D., Bruna E.M. (2015) Context-dependent outcomes of mutualistic interactions. In: Bronstein JL (ed) *Mutualism*. Oxford University Press, Oxford, pp 181–202.
<https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780199675654.003.0010>

Izzo T.J., Vasconcelos H.L. (2002) Cheating the cheater: domatia loss minimizes the effects of ant castration in an Amazonian ant-plant. *Oecologia* **133**:200–205. <https://doi.org/10.1007/s00442-002-1027-0>

Jones I.M., Koptur S., Gallegos H.R., Tardanico J.P., Trainer P.A., Peña J. (2017) Changing light conditions in pine rockland habitats affect the intensity and outcome of ant-plant interactions. *Biotropica* **49**:83–91. <https://doi.org/10.1111/btp.12363>

Malé P.J.G., Leroy C., Dejean A., Quilichini A., Orivel J. (2012) An ant symbiont directly and indirectly limits its host plant's reproductive success. *Evolutionary Ecology* **26**:55–63.
<https://doi.org/10.1007/s10682-011-9485-7>

Malé P.J.G., Leroy C., Lusignan L., Petitclerc F., Quilichini A., Orivel J. (2015) The reproductive biology of the myrmecophyte, *Hirtella physophora*, and the limitation of negative interactions between pollinators and ants. *Arthropod-Plant Interactions* **9**:23–31.
<https://doi.org/10.1007/s11829-014-9352-x>

Mayer V.E., Frederickson M.E., McKey D., Blatrix R. (2014) Current issues in the evolutionary ecology of ant-plant symbioses. *New Phytologist* **202**:749–764.

<https://doi.org/10.1111/nph.12690>

Michelangeli F.A. (2003) Ant protection against herbivory in three species of *Tococa* (Melastomataceae) occupying different environments. *Biotropica* **35**:181–188.

<https://doi.org/10.1111/j.1744-7429.2003.tb00277.x>

Michelangeli F.A. (2005) *Tococa (Melastomataceae)*. Flora Neotropica Monograph 98, New York.

Moraes S.C., Vasconcelos H.L. (2009) Long-term persistence of a Neotropical ant-plant population in the absence of obligate plant-ants. *Ecology* **90**:2375–2383. <https://doi.org/10.1890/08-1274.1>

Poorter H., Niinemets Ü., Poorter L., Wright I.J., Villar R. (2009) Causes and consequences of variation in leaf mass per area (LMA): A meta-analysis. *New Phytologist* **182**:565–588.

<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02830.x>

Poorter H., Niinemets Ü., Ntagkas N., Siebenkäs A., Mäenpää M., Matsubara S., Pons T. (2019) A meta-analysis of plant responses to light intensity for 70 traits ranging from molecules to whole plant performance. *New Phytologist* **223**:1073–1105. <https://doi.org/10.1111/nph.15754>

Rozendaal D.M.A., Hurtado V.H., Poorter L. (2006) Plasticity in leaf traits of 38 tropical tree species in response to light; relationships with light demand and adult stature. *Functional Ecology* **20**:207–216. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2006.01105.x>

Solano P.J., Dejean A. (2004) Ant-fed plants: comparison between three geophytic myrmecophytes. *Biological Journal of the Linnean Society* **83**:433–439. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2004.00381.x>

Souza M.L., Duarte A.A., Lovato M.B., Fagundes M., Valladares F., Lemos-Filho J.P. (2018) Climatic factors shaping intraspecific leaf trait variation of a neotropical tree along a rainfall gradient. *PLoS ONE* **13**. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208512>

Trager M.D., Bhotika S., Hostetler J.A., Andrade G. V., Rodriguez-Cabal M.A., McKeon C.S., Osenberg C.W., Bolker B.M. (2010) Benefits for plants in ant-plant protective mutualisms: A meta-analysis. *PLoS ONE* **5**. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014308>

Valladares F., Niinemets Ü. (2008) Shade tolerance, a key plant feature of complex nature and consequences. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **39**:237–257.

<https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.39.110707.173506>

Vasconcelos H.L. (1991) Mutualism between *Maieta guianensis* Aubl., a myrmecophytic

melastome, and one of its ant inhabitants: ant protection against insect herbivores. *Oecologia* **87**:295–298. <https://doi.org/10.1007/BF00325269>

Willmer P.G., Stone G.N. (1997) How aggressive ant-guards assist seed-set in *Acacia* flowers. *Nature* **388**:165–167. <https://doi.org/10.1038/40610>

Xiao K., Mao X., Lin Y. (2017) Trichome, a functional diversity phenotype in plant. *Molecular Biology* **6**:1–6. <https://doi.org/10.4172/2168-9547.1000183>

Yamawo A., Hada Y. (2010) Effects of light on direct and indirect defences against herbivores of young plants of *Mallotus japonicus* demonstrate a trade-off between two indirect defence traits. *Annals of Botany* **106**:143–148. <https://doi.org/10.1093/aob/mcq093>

Yu D.W., Pierce N.E. (1998) A castration parasite of an ant-plant mutualism. *Proceedings of the Royal Society of London* **265**:375–382. <https://doi.org/10.1098/rspb.1998.0305>

Capítulo 1 - Importância relativa do mutualismo trófico e da proteção contra herbivoria na interação entre *Miconia tococa* e *Allomerus octoarticulatus*

Resumo

No mutualismo entre plantas mirmecófitas e formigas há uma troca de serviços e recursos alimentares. As plantas fornecem abrigo e local de nidificação para as formigas por meio de estruturas especializadas, e podem fornecer também alguma fonte de alimento, como nectários extraflorais ou corpúsculos alimentares. Em troca desses benefícios, as formigas protegem a planta hospedeira contra inimigos naturais e auxiliam na nutrição vegetal. Tanto a proteção contra herbívoros quanto o aporte nutricional podem aumentar o *fitness* da planta hospedeira. Entretanto, poucos estudos avaliaram a importância relativa de cada um desses benefícios dentro da interação planta-formiga. Com esse intuito, investiguei experimentalmente o mutualismo protetivo e trófico entre a mirmecófita *Miconia tococa* e a formiga *Allomerus octoarticulatus*, buscando responder as seguintes questões: (i) plantas colonizadas apresentam maior crescimento que plantas não colonizadas?; (ii) as plantas absorvem nutrientes provenientes das formigas?; e (iii) qual dos benefícios, a proteção contra herbívoros ou o apporte nutricional, é mais importante para o desenvolvimento das plantas?. Para isso, plântulas de *M. tococa* foram submetidas a cinco tratamentos: (i) colonização por *A. octoarticulatus*, (ii) protegidas contra herbívoros, (iii) protegidas contra herbívoros e com adição de fertilizante, (iv) com adição de fertilizante e (v) controle. Ao final de 30 meses de experimento, plantas colonizadas e plantas protegidas apresentaram maior altura, número de folhas e área foliar total que plantas controle ou apenas fertilizadas artificialmente, demonstrando que a proteção contra inimigos naturais é mais importante para o desenvolvimento da planta hospedeira do que o aporte nutricional fornecido pelas formigas. Além disso, análises de isótopos estáveis não evidenciaram o fluxo de nutrientes entre formigas e planta, indicando que essa contribuição pode ter um papel secundário, ou até mesmo inexistente, para a interação *M. tococa* – *A. octoarticulatus*.

Palavras-chave: mirmecófita, formiga, experimento, crescimento, fertilizante, Melastomataceae, isótopos estáveis.

Introdução

As interações entre os organismos de uma comunidade podem ser positivas, negativas ou neutras. Dentre as positivas, as interações mutualistas são aquelas em que ambos os indivíduos envolvidos são beneficiados (Stachowicz 2001). O mutualismo entre plantas mirmecófitas e algumas espécies de formigas é um caso bem conhecido de interação positiva (Heil & McKey 2003). Essas plantas apresentam estruturas especializadas, como domáceas ou caules ocos, que funcionam como abrigo e local de nidificação para as formigas (Davidson & McKey 1993). Além dessa proteção, as plantas hospedeiras podem fornecer alguma fonte de alimento para as formigas, como néctar extrafloral ou corpúsculos alimentares. Em troca desses benefícios, as formigas oferecem proteção contra herbívoros e patógenos e, ainda, podem auxiliar na nutrição vegetal (Fischer *et al.* 2002, 2003; Heil & McKey 2003; Dejean *et al.* 2012).

A proteção contra herbívoros já foi experimentalmente testada para diversas associações entre mirmecófitas e formigas, mostrando assim, que a retirada das colônias leva a um aumento da área foliar consumida (Vasconcelos 1991; Stanton & Palmer 2011; Bartimachi *et al.* 2015; Dejean *et al.* 2017). Deste modo, a taxa de herbivoria têm sido largamente utilizada como um indicativo do *fitness* das plantas hospedeiras, pois a redução da área fotossinteticamente ativa das plantas pode reduzir suas taxas de crescimento e potencial reprodutivo (Marquis 1984; Mothershead & Marquis 2000; Oliveira *et al.* 2015). Porém, análises mostram que esse efeito não é universal, e que medidas de herbivoria isoladamente podem levar a conclusões imprecisas acerca do efeito do mutualismo para o *fitness* da planta hospedeira (Chamberlain & Holland 2009; Trager *et al.* 2010). A fraca relação entre herbivoria e *fitness* pode ser devido a diversos fatores, como o comportamento das formigas em forragear apenas em estruturas vegetativas ou reprodutivas, ou mecanismos das plantas de tolerância à herbivoria (Trager *et al.* 2010). Dessa forma, estudos que avaliam diretamente o desenvolvimento da planta hospedeira, como o crescimento ou a reprodução podem melhor avaliar os benefícios envolvidos na interação planta-formiga.

Além do mutualismo protetivo, os estudos sobre mutualismo trófico, ou mirmecotrofia, são mais recentes e envolvem o uso de elementos radioativos e isótopos estáveis que permitem avaliar o fluxo de nutrientes entre formigas e plantas, de modo que plantas habitadas por formigas providas de alimento enriquecido com esses elementos conseguem incorporá-los ao seu tecido (Cabrera & Jaffe 1994; Fischer *et al.* 2003; Feldhaar *et al.* 2010). Esse fluxo acontece quando a matéria orgânica depositada nas domáceas, como restos de presas, excrementos, e formigas mortas, é absorvida diretamente pelas estruturas das plantas ou por intermediação de hifas de fungos presentes dentro dessas estruturas (Beattie 1989; Leroy *et al.* 2011). A mirmecotrofia foi primeiramente descrita para a interação entre formigas e plantas epífitas. Para essas plantas que crescem em ambientes com limitações nutricionais, fontes secundárias de nutrientes podem ser diferenciais em sua sobrevivência (Treseder *et al.* 1995; Gonçalves *et al.* 2016). Já para plantas mirmecófitas, que ocupam solos de regiões tropicais, apesar de estudos comprovarem o aporte nutricional pelas formigas, poucos estudos avaliaram o efeito desse para o *fitness* da hospedeira (Letourneau 1998; Dejean *et al.* 2013; Mayer *et al.* 2014)

Tanto a proteção contra herbívoros quanto a provisão de nutrientes são descritos como benefícios fornecidos pelas formigas mutualistas em troca de abrigo e/ou recurso alimentar da planta hospedeira (Mayer *et al.* 2014). Contudo, avaliar isoladamente a importância relativa de cada um desses efeitos no desenvolvimento das plantas pode trazer informações acerca dos processos ecológicos e evolutivos que atuam sob essas interações mutualistas (Letourneau 1998; Dejean *et al.* 2013). Nesse intuito, aqui foi utilizada a mirmecófita arbustiva *Miconia tococa* (Melastomataceae) como objeto de estudo. Essa espécie apresenta domáceas na base de suas folhas que são habitadas por formigas mutualistas (Michelangeli 2005). Estudos avaliando a interação entre *M. tococa* e espécies do gênero *Azteca*, *Crematogaster* e *Allomerus* demonstraram que na ausência das formigas as plantas sofreram mais danos por herbívoros, comprovando a efetividade da proteção pelas formigas (Michelangeli 2003; Moraes & Vasconcelos 2009). Além da proteção contra herbívoros,

Cabrera e Jaffe (1994), utilizando elementos radioativos, demonstraram que *M. tococa* é capaz de absorver nutrientes pelo tecido interno das domáceas. Entretanto, ainda são necessários estudos que avaliem o efeito das formigas no *fitness* da planta hospedeira e a contribuição que cada benefício isoladamente exerce para esse efeito.

Deste modo, investigando experimentalmente o mutualismo protetivo e trófico entre a mirmecófita *M. tococa* e a formiga *Allomerus octoarticulatus*, busquei responder as seguintes questões: (i) plantas colonizadas apresentam maior crescimento que plantas não colonizadas?; (ii) as plantas absorvem nutrientes provenientes das formigas?; e (ii) qual dos benefícios, proteção contra herbívoros ou aporte nutricional, é mais importante para o desenvolvimento das plantas?.

Material e métodos

Área de estudo

O estudo foi desenvolvido na Fazenda Experimental do Glória (FEG) ($18^{\circ}57'S$, $48^{\circ}12'W$), pertencente à Universidade Federal de Uberlândia e situada a 12 km do centro do município de Uberlândia/MG. A FEG possui uma área de 685 ha, sendo a maior parte ocupada por atividades agropastoris, e uma reserva de Floresta Estacional Semidecidual de 30 ha (Haridasan & Araújo 2005). O experimento foi alocado nas margens do córrego do Glória, local onde a espécie *M. tococa* ocorre naturalmente sem a colonização por formigas obrigatórias (Moraes & Vasconcelos 2009).

Obtenção das plântulas

Para a instalação do experimento, 85 plântulas entre 15 e 30 cm, advindas das cidades de Barra do Garças (MT), Mineiros (GO), Jataí (GO) e Uberlândia (MG) foram transplantadas para sacos plásticos próprio para mudas e igualmente aclimatadas em casa de vegetação. Após 6 meses de aclimatação, as plântulas foram transplantadas para a área de estudo e alocadas a pelo menos um metro de distância umas das outras.

Desenho amostral

As plântulas foram aleatoriamente submetidas a cada um dos seguintes tratamentos: (i) colonização por *Allomerus octoarticulatus* (doravante “formigas”), (ii) sem herbivoria (doravante “proteção”), (iii) sem herbivoria e com adição de fertilizante (proteção e fertilização), (iv) com adição de fertilizante (fertilização) e (v) sem formigas e sem tratamento para herbivoria ou fertilização (controle). Para o tratamento (i), colônias incipientes trazidas de Jataí (GO) foram transferidas para as plântulas (Fig. 1B). Para os tratamentos (ii) e (iii), gaiolas de ferro armado e tela com malha de 2 mm foram instaladas individualmente ao redor de cada plântula para impedir a entrada de herbívoros (Fig. 1E). Para minimizar os possíveis efeitos da gaiola na luminosidade e na entrada de água da chuva, os tratamentos (i), (iv) e (v) também receberam uma gaiola, porém com as laterais abertas, permitindo o acesso de herbívoros (Fig. 1D). Para os tratamentos (iii) e (iv), foi utilizado um fertilizante NPK (20:20:20, *Forth – Peters Professional*) diluído na proporção de 2 g de fertilizante para um litro de água destilada, conforme indicação do fabricante. O fertilizante foi aplicado semanalmente dentro das domáceas com o auxílio de uma seringa de 1 ml (Fig. 1C).



Figura 1. Experimento com a mirmecófita *Miconia tococa* conduzido na Fazenda Experimental do Glória, em Uberlândia, Minas Gerais. A – Indivíduo sendo medido; B – Rainha e colônia incipiente de *Allomerus octoarticulatus* sendo transferida para plântula; C – Injeção de fertilizante dentro das domáceas; D – Gaiola com as laterais abertas para permitir a entrada de herbívoros; e E – Gaiola fechada para impedir a entrada de herbívoros.

Medições

Antes do estabelecimento dos tratamentos e após 30 meses de experimento, foram tomadas as seguintes medidas de cada planta: altura total, número de folhas, área foliar total e média foliar (Fig. 1A). A área foliar total é a soma da área foliar de todas folhas do indivíduo ($AFT = \sum AF$) e a média foliar é a área foliar total dividida pelo número de folhas medidas ($MF = AFT/n$, onde n é o número de folhas medidas do indivíduo). A área foliar (AF) foi estimada pela equação: $AF = 0,325 + 0,7323 \times (\text{comprimento da folha} \times \text{largura da folha})$ (Moraes & Vasconcelos 2009).

Durante o experimento, 30 indivíduos morreram, sendo a principal causa de morte a dessecação nos períodos de seca. Entre os indivíduos sobreviventes, alguns foram excluídos das

análises estatísticas porque não se desenvolveram para além do estágio de plântula. Para ser considerado como desenvolvido, o indivíduo deveria apresentar ao menos uma folha com domácea. Dessa forma, 47 indivíduos foram considerados para as análises: formigas (oito), proteção (onze), proteção e fertilização (dez), fertilização (oito) e controle (nove).

Análise de isótopos estáveis

As assinaturas isotópicas ($\delta^{15}\text{N}$) das plantas refletem a $\delta^{15}\text{N}$ da sua fonte de nitrogênio (Ehleringer *et al.* 1986). Como restos alimentares e carcaças deixadas pelas formigas dentro das domáceas apresentam valores maiores de $\delta^{15}\text{N}$ que o solo, a absorção dessa matéria orgânica pode ser identificada nos tecidos das plantas (Sagers *et al.* 2000). Do mesmo modo, os fertilizantes químicos possuem traços isotópicos característicos e também podem ser identificados nos tecidos (Bateman & Kelly 2007). Assim, para avaliar a possível transferência de nutrientes das formigas e da fertilização artificial para os tecidos da planta, folhas jovens e totalmente expandidas de 14 indivíduos foram coletadas ao final do experimento (cinco colonizados por *A. octoarticulatus*, cinco fertilizados artificialmente e quatro do tratamento controle). As amostras foliares foram secas na estufa a 60 °C por 48h e posteriormente maceradas com o auxílio de um almofariz e pistilo de ágata. Após maceradas, 2 a 3 g de cada amostra foram pesadas, transferidas para cápsulas de estanho e enviadas para análise em espectrômetro de massa de razão isotópica (UC Davis Stable Isotope Facility, Davis, Califórnia, EUA).

Os resultados obtidos foram expressos pela notação por mil ($\delta^{15}\text{N} \text{‰}$), tendo como referência um padrão internacionalmente reconhecido. A equação para obter as assinaturas isotópicas é definida como: $\delta^{15}\text{N}(\text{‰}) = (\text{R}_{\text{amostra}} - \text{R}_{\text{padrão}}) / \text{R}_{\text{padrão}} \times 1000$. O R representa a razão molar ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) da amostra e do padrão. O padrão usado para o nitrogênio é o ar atmosférico ($\text{R}_{\text{padrão}} = 0,0036765$) (Ehleringer *et al.* 1986; Bateman & Kelly 2007).

Análise de dados

Para avaliar se o desenvolvimento das plantas diferiu entre os tratamentos, os valores de altura, número de folhas, área foliar total e média foliar dos indivíduos ao final de 30 meses foram comparados por meio de uma ANOVA e pelo teste *post-hoc* de Fisher (LSD). Como os dados não apresentavam distribuição normal e homogeneidade de variância, os dados foram submetidos a uma transformação logarítmica para atender as premissas do teste. Para minimizar disparidades anteriores ao experimento, os valores iniciais de altura, número de folhas, área foliar total e média foliar foram utilizados como covariáveis em cada respectiva análise. Um indivíduo do grupo controle foi apontado como *outlier* durante as análises e foi excluído da análise.

Para comparar as assinaturas isotópicas ($\delta^{15}\text{N}\text{\%}$) entre os grupos selecionados, foi realizada uma ANOVA por permutações com o pacote ‘coin’, pois essa análise permite comparar amostras de número reduzido (Hothorn *et al.* 2006). O teste de comparação múltipla *a posteriori* foi feito utilizando o pacote ‘rcompanion’ (Mangiafico 2016). Todas as análises foram realizadas no software R (R Core Team 2017).

Resultados

Houve diferenças significativas entre as plantas de diferentes tratamentos quanto à altura ($F_{4,40} = 4,11$; $p < 0,01$), número de folhas ($F_{4,40} = 5,15$; $p < 0,01$) e área foliar total ($F_{4,40} = 5,49$; $p < 0,01$). Porém não houve diferença entre os tratamentos quanto à área foliar média ($F_{4,40} = 1,94$; $p = 0,12$). As covariáveis altura inicial, número inicial de folhas e área foliar total inicial não foram significativas nas análises (altura: $F_{1,40} = 2,47$; $p = 0,12$; folhas: $F_{1,40} = 0,48$; $p = 0,5$; área foliar: $F_{1,40} = 1,53$; $p = 0,22$). Para os três parâmetros significativos, os tratamentos que apresentavam proteção contra herbivoria não diferiram das plantas colonizadas por *A. octoarticulatus*, enquanto que plantas

controle e somente fertilizadas apresentaram menor número de folhas, altura e área foliar total que as plantas colonizadas (Fig. 2A, B e C).

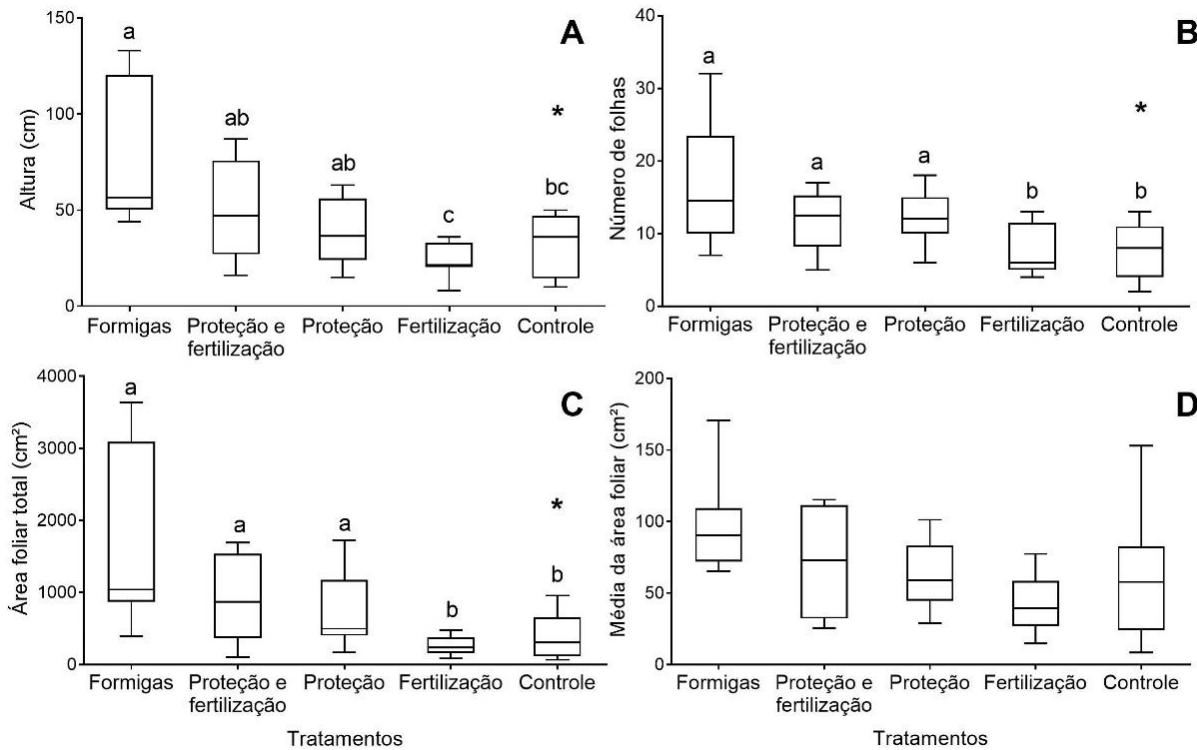


Figura 2. Efeito dos tratamentos nos diferentes parâmetros de crescimento vegetativo de *Miconia tococa* ao final de 30 meses de experimento. Diferenças significativas entre tratamentos estão indicadas por letras minúsculas. O asterisco representa o indivíduo controle considerado como *outlier* e retirado das análises estatísticas.

As assinaturas isotópicas ($\delta^{15}\text{N}$) não diferiram entre as plantas colonizadas, fertilizadas artificialmente e controle ($\text{maxT} = 1,91$; $p = 0,135$; Fig. 3), porém, nas comparações entre os pares de tratamento, houve uma diferença marginalmente significativa entre as plantas fertilizadas e as plantas controle (Fig. 3; $p = 0,051$).

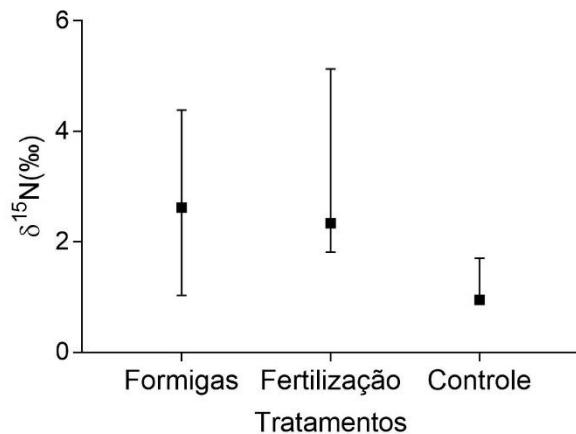


Figura 3. Assinaturas isotópicas de ^{15}N dos grupos selecionados: plantas de *Miconia tococa* colonizadas por *Allomerus octoarticulatus* (formigas), plantas fertilizadas com NPK (fertilização) e plantas controle. O ponto representa a mediana dos valores e as barras representam os valores máximos e mínimos.

Discussão

Através de um extensivo experimento em campo, vemos que a proteção contra herbivoria afetou positivamente o crescimento dos indivíduos de *M. tococa*, com resultado similar nos indivíduos colonizados por formigas, enquanto que o aporte nutricional não afetou seu crescimento.

Devido às dificuldades de avaliar diretamente a reprodução de determinadas espécies, muitos estudos utilizam medidas indiretas para inferir sobre o sucesso reprodutivo das plantas, como o tamanho ou biomassa (Tracey & Aarssen 2014; Younginger *et al.* 2017). Considerando indivíduos de mesma espécie e mesma classe de idade, indivíduos maiores apresentam melhores chances de sobrevivência e, assim, melhores chances de reproduzir e deixar descendentes férteis (Younginger *et al.* 2017). Devido ao crescimento lento de *M. tococa*, as plantas utilizadas no experimento não reproduziram em tempo hábil para que o sucesso reprodutivo fosse avaliado diretamente, mas considerando o maior investimento de recursos para crescimento em altura e número de folhas das plantas protegidas contra herbivoria, podemos inferir que esses indivíduos também apresentarão

maior sucesso reprodutivo que plantas não protegidas. Apesar das plantas sem formigas ou sem proteção sobreviverem, elas crescem menos, o que pode afetar a reprodução a longo prazo.

A herbivoria pode afetar negativamente o *fitness* de algumas plantas, já que pode reduzir as taxas de crescimento, reprodução e até mesmo a sobrevivência (Marquis 1984; Mothershead & Marquis 2000; Oliveira *et al.* 2015), apesar de alguns estudos não encontrarem uma relação direta entre taxas de herbivoria e sucesso reprodutivo (Trager *et al.* 2010). Plantas de crescimento mais lento tendem a ser mais prejudicadas pela herbivoria, já que a reposição de tecido vegetal é muito onerosa energeticamente, e, por isso, podem desenvolver mais mecanismos de defesa que plantas de crescimento rápido (Coley 1988; mas ver também Lamarre *et al.* 2012). *M. tococa* é uma mirmecófita de crescimento lento e que habita principalmente locais sombreados, assim como a área em que foi instalado o experimento aqui apresentado. Nesse ambiente em que a luz é um fator limitante ao desenvolvimento das plantas (Tang 1997), a proteção contra herbívoros apresentou um efeito positivo sobre o crescimento dos indivíduos de *M. tococa*, o que demonstra a importância da interação com as formigas para o desenvolvimento das plantas.

Em relação ao aporte nutricional, não há um consenso de que o fornecimento de nutrientes leva à um incremento no *fitness* das plantas em geral, já que a resposta à fertilização é muito variável entre espécies (Shaver & Chapin 1980; Copeland *et al.* 2012; Silva *et al.* 2015). Nos ambientes em que os nutrientes, como nitrogênio e fósforo, são limitantes para o desenvolvimento das plantas, um acréscimo de nutrientes pode levar a uma maior absorção e deposição de nutrientes nas folhas, estimulando o crescimento vegetativo e a reprodução (Copeland *et al.* 2012). Para indivíduos de *M. tococa* crescendo em uma mata de galeria, que apresenta maior fertilidade que fitofisionomias savânicas do Cerrado (Haridasan 2000), a fertilização com NPK não teve um efeito no crescimento vegetativo, possivelmente porque esses nutrientes não são fator limitante nesse local, ou a quantidade de nutrientes fornecidos não foi suficiente para afetar o crescimento. Vale ressaltar que o fertilizante

aqui utilizado fornece apenas macronutrientes, e a matéria orgânica depositadas pelas formigas apresenta composição complexa e variável, podendo ser considerada em trabalhos futuros.

Análises de isótopos estáveis com mirmecófitas demonstraram que plantas colonizadas apresentam valores maiores de $\delta^{15}\text{N}$ do que plantas não colonizadas, indicando que as hospedeiras são capazes de absorver nitrogênio dos restos alimentares e de carcaças deixadas dentro das domáceas pelas formigas (Sagers *et al.* 2000; Solano & Dejean 2004). Porém, esse fluxo de nutrientes não foi evidenciado para todas as espécies (Solano & Dejean 2004; Mayer *et al.* 2014; Oliveira *et al.* 2015), assim como também não foi demonstrado para *M. tococa* durante o presente experimento. Já quanto à fertilização artificial, após 30 meses de experimento, vemos uma clara tendência de aumento do $\delta^{15}\text{N}$ em plantas fertilizadas por NPK, sendo, portanto, um indício de que as domáceas dos indivíduos podem absorver os nutrientes fornecidos artificialmente.

No mutualismo entre mirmecófitas e formigas, a proteção contra herbívoros foi inicialmente descrita como o benefício gerado pelas formigas em troca de abrigo (Vasconcelos 1991; Heil & McKey 2003). Estudos posteriores demonstraram que a matéria orgânica produzida pelas formigas pode ser absorvida pelas plantas e incorporada em seus tecidos, servindo, pois, como uma fonte adicional de nutrientes (Fischer *et al.* 2003; Feldhaar *et al.* 2010). Para *M. tococa*, a interação com *A. octoarticulatus* é eficiente para reduzir as taxas de herbivoria (Moraes & Vasconcelos 2009; Bartimachi *et al.* 2015), o que afetou positivamente o crescimento da planta hospedeira. Já o aporte nutricional pelas formigas não foi evidenciado pela análise de isótopos estáveis, e a fertilização artificial não afetou o crescimento dos indivíduos, indicando que essa contribuição pode ter um papel secundário, ou até mesmo inexistente, para a interação *M. tococa – A. octoarticulatus*.

Referências

- Bartimachi A., Neves J., Vasconcelos H.L. (2015) Geographic variation in the protective effects of ants and trichomes in a Neotropical ant–plant. *Plant Ecology* **216**:1083–1090.
<https://doi.org/10.1007/s11258-015-0491-7>
- Bateman A.S., Kelly S.D. (2007) Fertilizer nitrogen isotope signatures. *Isotopes in Environmental and Health Studies* **43**:237–247. <https://doi.org/10.1080/10256010701550732>
- Beattie A. (1989) Myrmecotrophy: plants fed by ants. *TREE* **4**:172–176.
[https://doi.org/10.1016/0169-5347\(89\)90122-5](https://doi.org/10.1016/0169-5347(89)90122-5)
- Cabrera M., Jaffe K. (1994) A trophic mutualism between the myrmecophytic Melastomataceae *Tococa guianensis* Aublet and an *Azteca* ant species. *Ecotropicos* **7**:1–10.
- Chamberlain S.A., Holland J.N. (2009) Quantitative synthesis of context dependency in ant-plant protection mutualisms. *Ecology* **90**:2384–2392. <https://doi.org/10.1890/08-1490.1>
- Coley P.D. (1988) Effects of plant growth rate and leaf lifetime on the amount and type of anti-herbivore defense. *Oecologia* **74**:531–536. <https://doi.org/10.1007/BF00380050>
- Copeland S., Bruna E., Silva L. (2012) Short-term effects of elevated precipitation and nitrogen on soil fertility and plant growth in a Neotropical savanna. *Ecosphere* **3**:1–20.
<https://doi.org/10.1890/ES11-00305.1>
- Davidson D.W., McKey D. (1993) The evolutionary ecology of symbiotic ant-plant relationships. *Journal of Hymenoptera Research* **2**:13–83.
- Dejean A., Petitclerc F., Roux O., Orivel J., Leroy C. (2012) Does exogenic food benefit both partners in an ant-plant mutualism? The case of *Cecropia obtusa* and its guest *Azteca* plant-ants. *Comptes Rendus - Biologies* **335**:214–219. <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2012.01.002>

- Dejean A., Orivel J., Rossi V., Roux O., Lauth J., Malé P.J.G., Céréghino R., Leroy C. (2013) Predation success by a plant-ant indirectly favours the growth and fitness of its host myrmecophyte. *PLoS ONE* **8**:1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059405>
- Dejean A., Petitclerc F., Compain A., Azémard F., Corbara B., Delabie J.H.C., Leroy C. (2017) Hollow internodes permit a neotropical understory plant to shelter multiple mutualistic ant species, obtaining protection and nutrient provisioning (myrmecotrophy). *American Naturalist* **190**:E124–E131. <https://doi.org/10.1086/693782>
- Ehleringer J.R., Rundel P.W., Nagy K.A. (1986) Stable isotopes in physiological ecology and food web research. *TREE* **1**:42–45. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(86\)90072-8](https://doi.org/10.1016/0169-5347(86)90072-8)
- Feldhaar H., Gebauer G., Blüthgen N. (2010) Stable isotopes : past and future in exposing secrets of ant nutrition (Hymenoptera: Formicidae). *Myrmecological News* **13**:3–13.
- Fischer R.C., Richter A., Wanek W., Mayer V. (2002) Plants feed ants: food bodies of myrmecophytic *Piper* and their significance for the interaction with *Pheidole bicornis* ants. *Plant Animal Interactions* **133**:186–192. <https://doi.org/10.1007/s00442-002-1000-y>
- Fischer R.C., Wanek W., Richter A., Mayer V. (2003) Do ants feed plants? A ¹⁵N labelling study of nitrogen fluxes from ants to plants in the mutualism of *Pheidole* and *Piper*. *Journal of Ecology* **91**:126–134. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2745.2003.00747.x>
- Gonçalves A.Z., Oliveira R.S., Oliveira P.S., Romero G.Q. (2016) Species-Specific effects of ant inhabitants on bromeliad nutrition. *PLoS ONE* **11**:1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152113>
- Haridasan M. (2000) Nutrição mineral de plantas nativas do Cerrado. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* **12**:54–64.
- Haridasan M., Araújo G.M. (2005) Perfil nutricional de espécies lenhosas de duas florestas

semidecíduas em Uberlândia, MG. Revista Brasileira de Botânica **3**:295–303.

<https://doi.org/10.1590/S0100-84042005000200010>

Heil M., McKey D. (2003) Protective ant-plant interactions as model systems in ecological and evolutionary research. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics **34**:425–553.

<https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132410>

Lamarre G.P.A., Baraloto C., Fortunel C., Dávila N., Mesones I., Rios J.G., Ríos M., Valderrama E., Pilco M.V., Fine P.V.A. (2012) Herbivory, growth rates, and habitat specialization in tropical tree lineages: Implications for Amazonian beta-diversity. Ecology **93**: S195-S210.

<https://doi.org/10.1890/11-0397.1>

Leroy C., Séjalon-Delmas N., Jauneau A., Ruiz-González M.X., Gryta H., Jargeat P., Corbara B., Dejean A., Orivel J. (2011) Trophic mediation by a fungus in an ant-plant mutualism. Journal of Ecology **99**:583–590. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2010.01763.x>

Letourneau D.K. (1998) Ants, stem-borers, and fungal pathogens: experimental tests of a fitness advantage in *Piper* ant-plants. Ecology **79**:593–603. <https://doi.org/10.2307/176956>

Mangiafico S.S. (2016) Summary and analysis of extension program evaluation in R, version 1.18.1. rcompanion.org/handbook/. (Pdf version: rcompanion.org/documents/RHandbookProgramEvaluation.pdf.)

Marquis R.J. (1984) Leaf herbivores decrease fitness of a tropical plant. Science **226**:537–539.

<https://doi.org/10.1126/science.226.4674.537>

Mayer V.E., Frederickson M.E., McKey D., Blatrix R. (2014) Current issues in the evolutionary ecology of ant-plant symbioses. New Phytologist **202**:749–764.

<https://doi.org/10.1111/nph.12690>

Michelangeli F.A. (2003) Ant protection against herbivory in three species of *Tococa*

- (Melastomataceae) occupying different environments. *Biotropica* **35**:181–188.
<https://doi.org/10.1111/j.1744-7429.2003.tb00277.x>
- Michelangeli F.A. (2005) Tococa (*Melastomataceae*). Flora Neotropica Monograph 98, New York.
- Moraes S.C., Vasconcelos H.L. (2009) Long-term persistence of a Neotropical ant-plant population in the absence of obligate plant-ants. *Ecology* **90**:2375–2383. <https://doi.org/10.1890/08-1274.1>
- Mothershead K., Marquis R.J. (2000) Fitness impacts of herbivory through indirect effects on plant-pollinator interactions in *Oenothera macrocarpa*. *Ecology* **81**:30–40.
<https://doi.org/10.2307/177131>
- Oliveira K.N., Coley P.D., Kursar T.A., Kaminski L.A., Moreira M.Z., Campos R.I. (2015) The effect of symbiotic ant colonies on plant growth: A test using an *Azteca-Cecropia* system. *PLoS ONE* **10**:1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120351>
- R Core Team (2017) *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria [online]. <https://www.R-project.org/>
- Sagers C.L., Ginger S.M., Evans R.D. (2000) Carbon and nitrogen isotopes trace nutrient exchange in an ant-plant mutualism. *Oecologia* **123**:582–586. <https://doi.org/10.1007/PL00008863>
- Shaver G.R., Chapin F.S. (1980) Response to fertilization by various plant growth forms in an Alaskan Tundra: nutrient accumulation and growth. *Ecology* **61**:662–675.
<https://doi.org/10.2307/1937432>
- Silva R.R.P., Oliveira D.R., Rocha G.P.E., Vieira D.L.M. (2015) Direct seeding of Brazilian savanna trees: effects of plant cover and fertilization on seedling establishment and growth. *Restoration Ecology* **23**:393–401. <https://doi.org/10.1111/rec.12213>
- Solano P.J., Dejean A. (2004) Ant-fed plants: comparison between three geophytic myrmecophytes. *Biological Journal of the Linnean Society* **83**:433–439. <https://doi.org/10.1111/j.1095->

8312.2004.00381.x

Stachowicz J.J. (2001) Mutualism, facilitation, and the structure of ecological communities.

BioScience **51**:235–246. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2001\)051\[0235:MFATSO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2001)051[0235:MFATSO]2.0.CO;2)

Stanton M.L., Palmer T.M. (2011) The high cost of mutualism: effects of four species of East African ant symbionts on their myrmecophyte host tree. Ecology **92**:1073–1082.

<https://doi.org/10.1890/10-1239.1>

Tang Y. (1997) Light. In: Prasad MN V. (ed) Plant Ecophysiology. John Wiley & Sons, New York, pp 3–40.

Tracey A.J., Aarssen L.W. (2014) Revising traditional theory on the link between plant body size and fitness under competition: evidence from old-field vegetation. Ecology and Evolution **4**:959–967. <https://doi.org/10.1002/ece3.1001>

Trager M.D., Bhotika S., Hostetler J.A., Andrade G. V., Rodriguez-Cabal M.A., McKeon C.S., Osenberg C.W., Bolker B.M. (2010) Benefits for plants in ant-plant protective mutualisms: A meta-analysis. PLoS ONE **5**. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014308>

Treseder K.K., Davidson D.W., Ehleringer J.R. (1995) Absorption of ant-provided carbon dioxide and nitrogen by a tropical epiphyte. Nature **375**:137–139. <https://doi.org/10.1038/375137a0>

Vasconcelos H.L. (1991) Mutualism between *Maieta guianensis* Aubl., a myrmecophytic melastome, and one of its ant inhabitants: ant protection against insect herbivores. Oecologia **87**:295–298. <https://doi.org/10.1007/BF00325269>

Younginger B.S., Sirová D., Cruzan M.B., Ballhorn D.J. (2017) Is biomass a reliable estimate of plant fitness? Applications in Plant Sciences **5**:1600094. <https://doi.org/10.3732/apps.1600094>

Capítulo 2 - Extranuptial nectaries in flowers: ants increase the reproductive success of the ant-plant *Miconia tococa* (Melastomataceae)*

*Aceito para publicação na Revista *Plant Biology* – maio/2020 - DOI:10.1111/plb.13138

Abstract

Although the production of extranuptial nectar is a common strategy of indirect defense against herbivores among tropical plants, the presence of extranuptial nectaries in reproductive structures is rare, especially in ant-plants. This is because the presence of ants in reproductive organs can generate conflicts between the partners, as ants can inhibit the activity of pollinators or even castrate their host-plants. Here we evaluate the hypothesis that the ant-plant *Miconia tococa* produces nectar in its petals which attracts ants and affects fruit set. Floral buds were analyzed using anatomical and histochemical techniques. The frequency and behavior of floral visitors were recorded in field observations. Finally, an ant exclusion experiment was conducted to evaluate the effect of ant presence on fruit production. The petals of *M. tococa* have a secretory epidermis that produces sugary compounds. Nectar production occurred during the floral bud stage and attracted 17 species of non-obligate ants (i.e., that have a facultative association with ant-plants). Ants foraged only on floral buds, and thus did not affect the activity of pollinators in the neighboring open-flowers. The presence of ants in the inflorescences increased fruit production by 15%. To our knowledge, the production of extranuptial nectar in the reproductive structures of a myrmecophyte is very rare, with few records in the literature. Although studies show conflicts between the partners in ant-plant interaction, ants that forage on *M. tococa* floral buds protect the plant against floral herbivores without affecting bee pollination.

Keywords: mutualism; myrmecophytes; extrafloral nectar; ant-pollinator interactions; *Tococa guianensis*

Introduction

Angiosperms and ants are among the most diverse and dominant groups of organisms in terrestrial ecosystems, which allow them to maintain a broad set of interactions (Hölldobler & Wilson 1990; Soltis & Soltis 2004). Ants may use plants as food, as a foraging surface and/or as nesting sites (Rico-Gray & Oliveira 2007). The results of the interactions between ants and plants vary from antagonistic, as in the case of leaf-cutting ants, to mutualistic, when ants defend the plants against herbivores or when they pollinate flowers (Rico-Gray & Oliveira 2007). In order to gain protection against enemies, many plants exhibit strategies to attract ants (Aljbory & Chen 2018). One such strategy is the production of extranuptial or extrafloral nectar, an aqueous solution rich in sugars and other nutrients, which functionally is not related to pollination and can be secreted by nectaries present in vegetative or reproductive structures (Schmid 1988; Marazzi *et al.* 2013). Some biologists use the terms extranuptial and extrafloral as synonyms, but the term extrafloral refers to nectaries that are not in reproductive structures, while extranuptial is associated to nectary function, in any location on the plant (Schmid 1988). Although the term extrafloral has been used commonly, here we adopt the term extranuptial because of its relationship to functionality.

Many studies have shown that ants visiting extranuptial nectaries (ENN) defend the plant against herbivores and thus reduce herbivory rates (Chamberlain & Holland 2009; Rosumek *et al.* 2009; Trager *et al.* 2010; Calixto *et al.* 2018). But in spite of these benefits, conflicts between mutualistic partners are relatively common. For example, when ENNs are present in the reproductive structures, ant effects can be either positive or negative depending on whether ants interfere or not with the activity of the pollinators (Ness 2006; Pereira & Trigo 2013; Barônio & Del-Claro 2018) and if they prey or not on floral herbivores (Barton 1986; Sobrinho *et al.* 2002; Nascimento & Del-Claro 2010). In the case of ant-plants (myrmecophytes), which are plants that have developed specialized structures - known as domatia - to shelter ants, several cases of conflict between the partners have been reported, including cases of host-plant castration and of ant attacks on pollinator

insects (Yu & Pierce 1998; Izzo & Vasconcelos 2002; Gaume *et al.* 2005; Malé *et al.* 2012). Thus, several ant-plants present strategies to avoid the presence of ants in their reproductive organs, such as the production of volatile ant repellents in young flowers (Willmer & Stone 1997), the temporal and spatial segregation of ant and pollinator rewards as to prevent interactions (Gaume *et al.* 2005; Malé *et al.* 2015), or the abortion of domatia from leaves located in the reproductive branches (Izzo & Vasconcelos 2002).

The production of extranuptial nectar in the reproductive organs of ant-plants is rare, being known in only one species, *Humboldtia brunonis* (Fabaceae) from western India (Shenoy *et al.* 2012). However, a study on the phylogeny of the Melastomataceae suggests that another ant-plant, *Miconia tococa* (Desr.) Michelang. (formerly known as *Tococa guianensis* Aubl.; Michelangeli *et al.* 2019) produces nectar in its petals (Renner 1993). *Miconia tococa* is a shrub that occurs primarily in forest environments and has a wide geographical distribution, ranging from southern Mexico to the southeastern region of Brazil (Michelangeli 2005). Throughout most of its range, *M. tococa* is associated with ants that nest only in myrmecophytes (also known as obligate plant-ants). Some of these ant species, including species of the genera *Azteca*, *Crematogaster* and *Allomerus*, provide protection to the foliage of *M. tococa* (Bizerril & Vieira 2002; Michelangeli 2003; Moraes & Vasconcelos 2009). However, at the southern limit of its distribution, where this study was developed, *M. tococa* is associated only with non-obligate ants (i.e., that have a facultative association with ant-plants) (Moraes & Vasconcelos 2009), and the latter are not effective in protecting the leaves of their host-plants against herbivores (Bartimachi *et al.* 2015). However, non-obligate ants also forage on the inflorescences of *M. tococa* and thus may have an effect on plant reproduction.

Considering the rarity of extranuptial nectaries in ant-plants' reproductive structures and the possible conflicts between ants and sexual reproduction of the host-plants, here we addressed the following questions: Do *M. tococa* produce extranuptial nectar on the flowers petals? Are non-

obligate ants attracted to this extranuptial nectar? If so, does the presence of ants affect fruit production?

Materials and methods

Study sites

The study was carried out in two sites located in Uberlândia, Minas Gerais state, Brazil. One of the sites is the *Fazenda Experimental do Glória* (FEG) ($18^{\circ}57'32"S$, $48^{\circ}12'41"W$), which belongs to the Federal University of Uberlândia (UFU). Our study took place in a 30-ha forest reserve found at FEG (Haridasan & Araújo 2005). Previous studies in this area recorded the occurrence of *M. tococa* near water bodies and at the edge of gallery forests (Moraes & Vasconcelos 2009). The other experimental site was *Parque do Sabiá* (PS) ($18^{\circ}54'52"S$, $48^{\circ}14'02"W$), where *M. tococa* is found along the forested margins of a water reservoir.

Study species

Miconia tococa (Melastomataceae) is a shrub (1-5 m in height) which has pubescent leaves, domatia at the base of the leaves, and terminal panicle inflorescences that can produce more than 50 flowers. The floral buds are obtuse, and the flowers are dichlamydeous, dialipetal, hermaphrodites and pentamerous. Its fruits are conspicuous blackened berries, and are bird dispersed (Michelangeli 2005). The species is self-incompatible, depending on cross-pollination by buzz-pollinating bees for fruit production (Cardoso *et al.* 2017). Flowering occurs mainly at the beginning of the rainy season with two or three flowers open each day per inflorescence (Ranieri *et al.* 2013).

Throughout most of its range, *M. tococa* is associated with obligate plant-ants (Moraes & Vasconcelos 2009). However, at our study sites, *M. tococa* is associated with a suite of non-obligate ant species which forage on the plant's surface and uses the domatia as shelter, as satellite nests or to tend hemipterans insects.

Structure of the extranuptial nectary and its resource production

Anatomical and histochemical analyses were performed using floral buds collected from five individuals of *M. tococa* in the first hours of the day from both study sites. The material was fixed in FAA (formalin, acetic acid, ethanol 50%, 1:1:18) for 48h (Johansen 1940), dehydrated in an ethanol series, included in Historesin (Leica®), and sectioned with a rotary microtome (YD315, Chine), producing 5 µm thick slices. For structural characterization, the samples were stained with 0.05% toluidine blue, pH 4.6 (O'Brien *et al.* 1965), and mounted with Entellan®. To detect neutral polysaccharides (McManus 1948), some sections without staining were submitted to the histochemical PAS reaction (Schiff Periodic Acid). The Fehling's reagent was used to detect reducing sugars in fresh and uncut petals, which consists of the combination of solution "A" (II copper sulfate 6.93% w: v) and "B" (sodium potassium tartrate 34.6% and 12% sodium hydroxide m:m: v), with subsequent heating of the slide with the samples to pre-boiling temperature (Sass 1951).

To quantify the amount of nectar in the floral buds we collected, with the aid of 5 µL microcapillaries, the nectar produced at the surface of 20 buds from five randomly selected plants. These floral buds were isolated from ants (as described in the section "*ant exclusion experiment*"). The collections were performed during the first hours of the day (from 6 to 7 a.m.) as previous observations showed this to be the time of greatest nectar production. The height of the liquid inside the capillary was measured for subsequent calculation of the volume of nectar produced. To determine the concentration of sugars in the nectar, a portable refractometer (Eclipse - 50% Brix) was used.

Floral visitors

In order to identify the floral visitors of *M. tococa* and observe their behavior, field observations were performed at both sites. We recorded the presence of floral visitors during day

time (from 6 a.m. to 5 p.m.), for a period of 30 min in each plant included in the experiment ($n = 19$), for two days in each site, totaling 44 h of observation. We observed a different plant during each 30-min period, and recorded the number of visits per plant and the behavior of the floral visitors. We also recorded, during two days in each site, the presence of ants in the inflorescences every three hours (from 6 a.m. to 5 p.m.), and in each observation the number of foraging ants in each inflorescence was recorded. Specimens of the most frequent ant visitors were collected for identification through comparison with the material deposited at the Zoological Collection from UFU.

Ant exclusion experiment

The experiment was carried out between August and November 2018. As the density of *M. tococa* adults in the study sites is low, especially at FEG, all individuals with reproductive branches were included in the experiment, totaling 19 individuals (seven at FEG and 12 at PS). However, over the course of the experiment, some individuals died or were defoliated by leaf-cutting ants, resulting in 13 individuals at the end of the experiment (three at FEG and ten at PS). The branches with inflorescences from each plant individual were randomly subject to two treatments: with ants (control branches) and ants removed (treatment branches). We removed manually all ants present in the inflorescences of the treatment branches and then applied a resin (Tanglefoot®) to prevent ant access. The total number of branches in each individual ranged from four to eight, depending on the size of each plant.

Whenever a new inflorescence was produced it was tagged and then at weekly intervals, we recorded the number of floral buds present in that inflorescence. This process was repeated until the production of floral buds ceased. Then we started to count – at a weekly basis - the number of immature fruits found in each inflorescence until fruit production ceased. As mature fruits rapidly fall into the ground or were consumed by animals, mainly birds, it was not possible to count the

fruits that reached the mature stage, and therefore we considered for the calculation of the reproductive success only the immature fruits produced.

We built a Generalized Linear Mixed Model (GLMM), assuming a binomial error distribution and using the logit linking function, to assess the effect of ants on the reproductive success of *M. tococa*. Branches, plants and sites were respectively nested and included as a random factor in this model. We used the number of successes (representing the maximum number of immature fruits recorded in each inflorescence) and number of failures (maximum number of floral buds recorded minus the maximum number of immature fruits) as the response variable using the “cbind” function. The analysis was conduct in the software R (version 3.4.0) (R Core Team 2017) using the “lme4” package (Bates et al. 2015).

Results

Structure of the extranuptial nectary and its resource production

The surface of the petals of *M. tococa* is rough due to the presence of an irregular surface (Figure 1B) with some tall cells. In section, the petals have a uniseriate epidermis, full of glandular trichomes (Figure 1C, E, F), and a homogeneous mesophyll composed of compact parenchyma cells and collateral vascular bundles (Figure 1C, D), which nearly reach the edge of the petals (Figure 1E). The PAS (Figure 1F, H) and Fehling’s reagent (Figure 1G) tests showed positive reactions for general polysaccharides and for reducing sugars, respectively, which confirms the sugary nature of the nectar. The positive reaction of the PAS was detected mainly in the epidermal cells (Figure 1F) and the apex of the petals (Figure 1H), being more intense in the abaxial surface of epidermis (Figure 1H). The secretory activity of the petal epidermis of *M. tococa* resulted in the production of droplets of nectar at the superior portion of the floral buds (Figure 1A and Figure 2B and D; note that in 2D it is possible to see a crystallized droplet of nectar that has not been consumed by floral visitors). Floral buds produce nectar until the anthesis, and nectar production is highest during early morning.

The analyses of the nectar produced in the floral buds of *M. tococa* showed that each bud secretes on average $0.64 \pm 0.44 \mu\text{L}$ (mean \pm S.D.) of nectar, and the nectar has a mean sugar concentration of sucrose of 25.7 ± 9.7 (mean \pm S.D.).

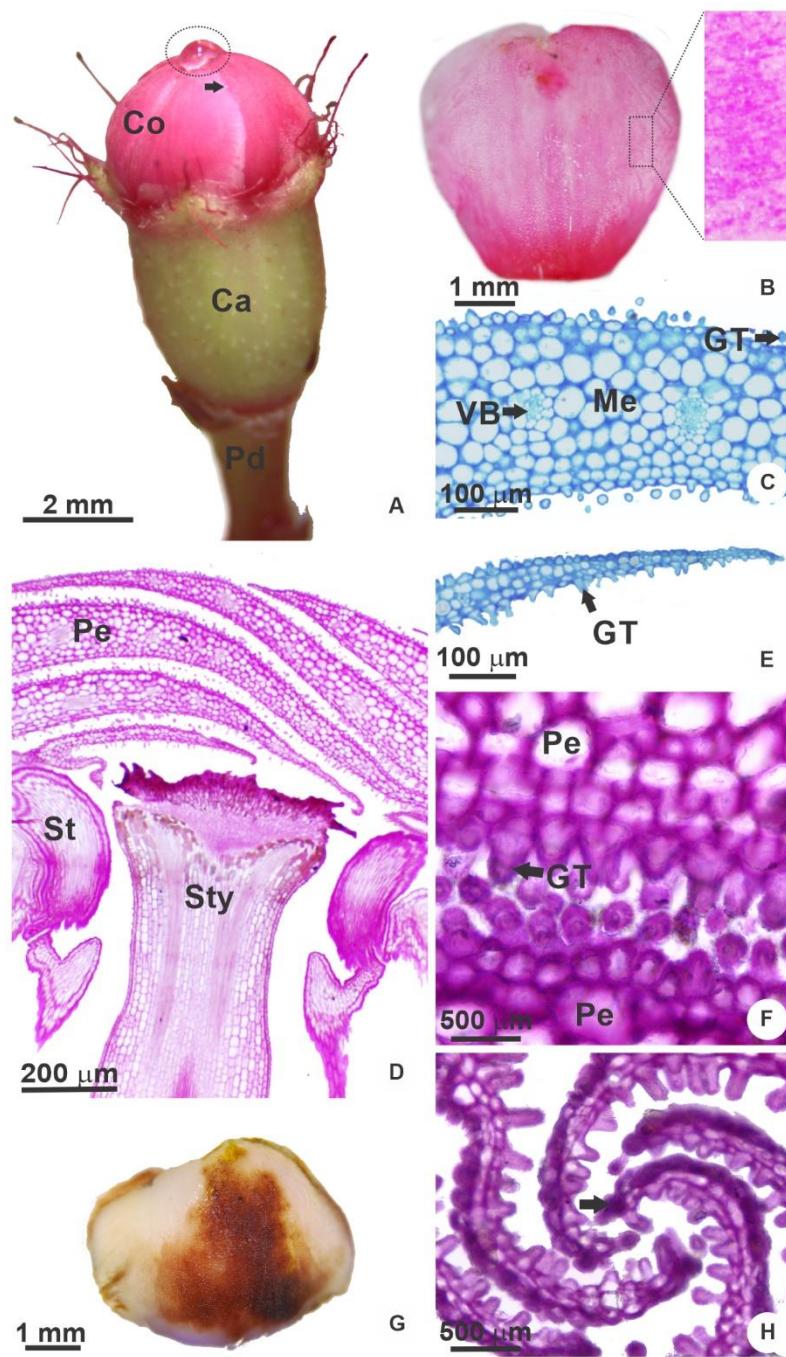


Figure 1. Structural and histochemical characterization of the floral buds of *Miconia tococa* (Melastomataceae). A - Overview of the external morphology of the floral bud, showing droplets of nectar at the apex (dotted circle) and the surface of the bud (black arrow); B - Macroscopic view of the petal, and details of its surface; C - Anatomical structure of the petal in a transverse section; D -

Anatomical structure of the floral bud in a longitudinal section; E - Petal apex in a longitudinal section; F, H - Positive test for general polysaccharides (PAS) for the glandular trichomes between two petals (F) and for the apex of the petals (H, black arrow indicates the location of a nectar droplet); G – Positive result for the Fehling test (indicated by brown color) showing the presence of reducing sugars on the petal surface from floral bud. Abbreviations: Ca - calyx; Co - corolla; Pd - peduncle; St - stamen; Sty - style; Pe - petal; Me - mesophyll; VB - vascular bundle; GT - glandular trichome.

Floral visitors

In total, nine species of bees were observed visiting the inflorescences of *M. tococa*. The most frequent pollinator species were *Bombus pauloensis* Friese 1913 and *Augochlora* spp. (Table 1 in Supporting Information; Figure 2E, F). Among the species recorded, *Apis mellifera* L. 1758 (Figure 2G) and *Trigona spinipes* (Fabricius 1793) were observed visiting the floral buds and feeding on the extranuptial nectar. These two species, therefore, were not involved in the pollination of *M. tococa*. In contrast, bees with buzz-pollination behavior were not seen feeding on extranuptial nectar. Our field observations showed that the flowers open at around 5:00 a.m., and that bees visit the flowers almost exclusively between 5 and 10 a.m. (Figure 3A). Only two or three flowers per inflorescence open per day, and these were visited more than once by the pollinators.

Ants were frequently seen foraging on the floral buds of *M. tococa* (Figure 2B, C). In total, 17 ant species belonging to nine different genera were found (Table 1 in Supporting Information). *Camponotus* and *Crematogaster* were the most frequent ant genera. The presence of ants in the floral buds was observed throughout the day, with a range of 5 to 10 ants per inflorescence at all observation hours, except at 5:00 p.m., when no ant activity was recorded on floral buds (Figure 3B). Although at the same inflorescence we simultaneously find floral buds, mature flowers, and fruits (Figure 2A, F), the presence of ants on open flowers was a rare and very brief event, occurring only when ants used the flowers to move on between buds. When the pollinator approached a flower frontally occupied by a large ant (*Camponotus* sp.) then the visit did not occur. However, as the ant presence was very brief, subsequently the flower was visited by the same or other bee species. In

another observation, with small ants of the genus *Crematogaster* and with a large bee, *Bombus pauloensis* (Figure 2F), the visit of the pollinator occurred even with the presence of ants in the front of the flower. On many occasions, ants were seen in the basal part of flowers, searching for the nectar in the apical portion of the opened flower petals, without interfering with bees or consuming other food resources in the inflorescences (Figure 2E).



Figure 2. Floral visitors of *Miconia tococa* (Melastomataceae). A - Inflorescence overview; B - *Crematogaster* sp. foraging on the floral buds, it is possible to see droplets of nectar on the buds; C - *Camponotus senex* foraging on the floral buds; D - Floral bud of *M. tococa* (without ants) exhibiting the crystallized sugar of the extranuptial nectar not consumed; E - Ant (*Camponotus* sp.) and

pollinator (*Augochlora* sp.) simultaneously visiting an open flower; F - Large bee (*Bombus pauloensis*) visiting a flower; G - *Apis mellifera* visiting the floral bud; H – Lepidoptera larvae consuming parts of the inflorescence (without ants); I – *Camponotus blandus* interacting a caterpillar.

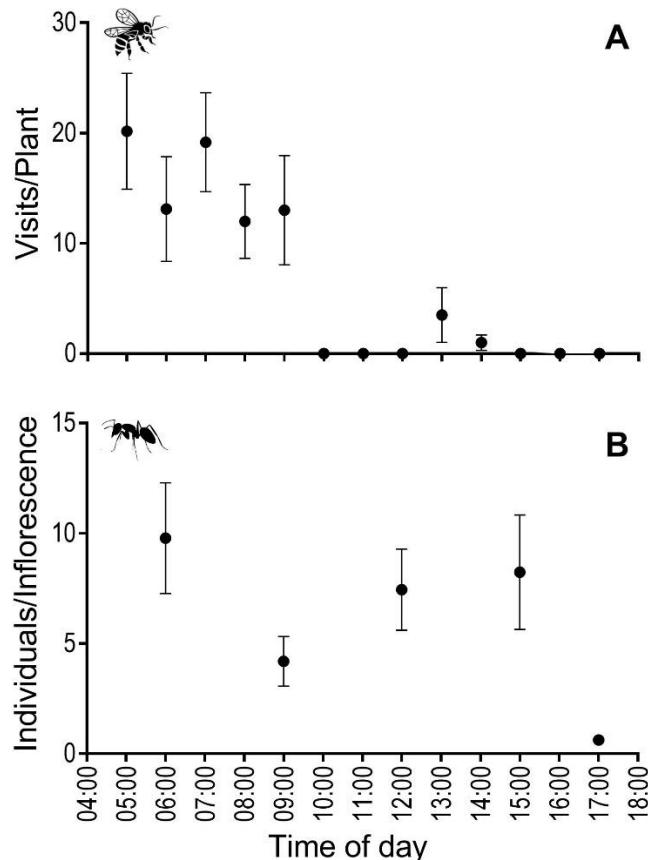


Figure 3. (A) Number of pollinating bees visiting the flowers, and (B) number of ants on the inflorescences of *Miconia tococa* at different times of the day. Values represent the mean and standard errors.

Ant exclusion experiment

In inflorescences with ants, 15% more floral buds developed fruits when compared to inflorescence without ants ($\chi^2 = 17.716$; $df = 1$; $p < 0.0001$) (Figure 4). The greatest loss of immature buds and fruits occurred due to the attack of herbivores, which pierce and consume the reproductive structures. However, it was not possible to quantify these damages, because once damaged, the reproductive structures were aborted. During the observations and during the experiment,

Lepidoptera larvae and adults of Coleoptera, Hemiptera and Orthoptera were observed feeding on floral and fruit tissues (Figure 2H, I).

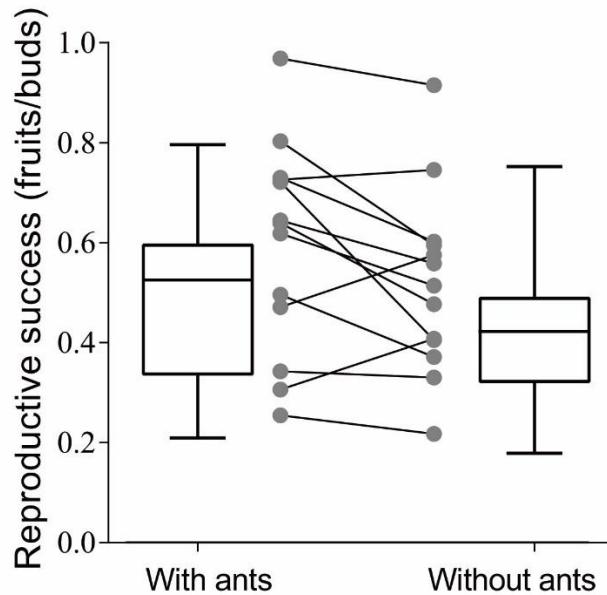


Figure 4. Proportion of buds that produced fruits (reproductive success) in inflorescences with or without ants. Each line in the center of the graph represents one individual of *Miconia tococa*.

Discussion

Our results showed clear evidence of secretory epidermis in the petals of *M. tococa*. This epidermis produces sugary compounds (nectar) that attract various species of non-obligate ants to the floral buds. To our knowledge, the production of extranuptial nectar in the reproductive structures of an ant-plant is very rare, with few records in the literature. In addition, we experimentally demonstrated that the presence of ants in the inflorescences increases fruit production, indicating that non-obligate ants protect the reproductive structures of *M. tococa* against floral herbivores without harming the pollination process by bees.

Structure of the extranuptial nectary and its resource production

The production of extranuptial nectar is considered an indirect strategy of defense against herbivores that is particularly common among tropical plants (Oliveira & Freitas 2004). Extranuptial nectar production is very variable, both at individual and population level, and can be influenced by several factors, such as environmental conditions and herbivory pressure (Mondor *et al.* 2006; Doak *et al.* 2007). Despite that, the concentration of sugars and the volume of nectar produced by *M. tococa* were similar to those reported for other species. For example, Díaz-Castelazo *et al.* (2005) found that plants with nectaries formed by glandular trichomes produce nectar volumes varying between 0.4 and 1.9 µL (while here mean nectar volume was 0.64 µL) with a concentration of sucrose ranging from 9.9 to 39.6% (here it was 25.7%).

The presence of nuptial or extranuptial nectaries is not common among the members of the plant family Melastomataceae (Varassin *et al.* 2008). In fact, extranuptial nectaries were reported for only two species of Melastomataceae. The first is *Medillina magnifica*, which presents a nectary in its petals, which was initially described as floral nectary (Tobe *et al.* 1989). Only later Vogel (1997) suggested that this nectary, due to its location, could not be related with plant pollination, and thus should be involved in the attraction of mutualistic ants. The second species, *Heterocentrom subtriplinervium*, presents extranuptial nectary on the petiole (Díaz-Castelazo *et al.* 2004). Similarly, as found in these two, non-myrmecophytic species of Melastomataceae, the extranuptial nectaries of *M. tococa* do not have an apparent gland or structure, and are therefore only perceptible when there is accumulation of the exudate. This condition, together with the individual and environmental variability in nectar production, may have contributed to the non-detection of this structure up to the present moment.

Floral visitors

The presence of ants on flowers can affect the sexual reproduction of exranuptial nectary-bearing plants (Pereira & Trigo 2013; Barônio & Del-Claro 2018). Part of this effect is due to the ability of the pollinators to identify and avoid ants on flowers, thus reducing the number of flowers which are pollinated (Cembrowski *et al.* 2014; Ibarra-Isassi & Oliveira 2018). In *M. tococa*, ants foraged only on floral buds, and therefore did not interfere with the activity of bees on open flowers. This is because nectar production ceases after the anthesis, thus preventing the ants from remaining in the open flowers and repelling the pollinators.

Several studies have shown that the greatest abundance of ants on plants occurs during the periods of highest nectar production (Chamberlain & Holland 2008; Holland *et al.* 2010; Dátillo *et al.* 2015), but here we observed that ants patrol the buds throughout the day, despite the fact that more nectar is secreted early in the morning than during the afternoon. This behavior is potentially important to maintain protection against floral herbivores throughout the day. Some plants produce exranuptial nectar from the floral bud stage to the fruit, thus ensuring protection at all stages of reproduction (Falcão *et al.* 2003; Holland *et al.* 2010). In *M. tococa*, in contrast, nectar production ceases after the anthesis, but as the inflorescence harbor all the reproductive stages concomitantly, it is likely that ant protection expands beyond the buds thus reducing the level of herbivore damage on newly-pollinated flowers and immature fruits as well.

Ant exclusion experiment

Our experiment and field observations indicate that non-obligate ants that visit the floral buds of *M. tococa* reduce the incidence of floral herbivores, but not the incidence of pollinators. Consequently, the presence of these ants increases the plant's reproductive success. This result reinforces the view that ants often have a positive effect on the reproductive success of their host-plants (reviewed Chamberlain & Holland 2009; Rosumek *et al.* 2009; Trager *et al.* 2010). In fact, the

meta-analysis performed by Trager *et al.* (2010) found that the presence of ants in plants increased their reproductive success by 49%, while the analysis of Rosumek *et al.* (2009) found that plants associated with ants increase their reproductive success by 24.3% on average. Here, there was a 15% increase in the proportion of flowers that became fruits. However, as we were unable to quantify the production of mature fruits, the magnitude of the ant effects on the reproduction of *M. tococa* may have been underestimated. It is important to emphasize that variations in the nature and magnitude of interaction-outcomes can occur between populations of the same species and between reproductive cycles of the same population (Hoeksema & Bruna 2015). Thus, considering the wide geographic distribution of *M. tococa*, it may well possible that ant effects against floral herbivores vary depending on the location and/or ant species associated with each population. In this regard, future studies should evaluate the effects of ants in other parts of *M. tococa* range, especially in those where ants which have an obligatory association with *M. tococa* are present.

In many areas, *M. tococa* is associated with the obligate plant-ant *Allomerus octoarticulatus* (Michelangeli 2005; Moraes & Vasconcelos 2009). Our preliminary observations in one of these areas indicate that *A. octoarticulatus* does not forage on the buds or flowers of its host-plant. However, surprisingly, we observed that non-obligate ants visit the inflorescences of plants with *A. octoarticulatus*, and thus potentially may also protect the plants against floral herbivores. In addition to *A. octoarticulatus*, ants of the genus *Azteca* are commonly found in *M. tococa*, especially in the geographical center of distribution of this myrmecophyte (Michelangeli 2005). Studies with *Azteca* show that they are attracted to extranuptial nectaries (ENNs) (Andrade 1984; Casique *et al.* 2018). Furthermore, there is evidence that the intake of sucrose by *Azteca* increases its maximum thermal tolerance (Bujan & Kaspari 2017). This suggests that extranuptial nectar may play a fundamental role in the nutrition and survival of *Azteca* species associated with *M. tococa*. On the other hand, these ants may have an important role in the defense of its host-plant, especially considering that *Azteca* tend to prefer more open and sunny habitats (Bizerril & Vieira 2002), where the occurrence

of flowering plants of *M. tococa* is much more common than in the shaded forest understory (Dejean *et al.* 2006, H. C. Belan and H. L. Vasconcelos, *personal observation*). Observations and experiments with *Azteca*-associated plants, however, are necessary to determine the potential role of ENNs on the performance of the ant colonies, as well as to determine the effect of *Azteca* on *M. tococa* floral herbivores. These studies are fundamental to better understand the evolutionary mechanisms and the role of extranuptial nectaries in the floral buds of *M. tococa*.

Acknowledgements

This study was financed in part by the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* - Brazil (CAPES - Finance Code 001) and the *Conselho Nacional de Pesquisas e Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq grants 302588/2015-9 and 441225/2016-0 to HLV). GJB is grateful for a postdoctoral fellowship awarded by CAPES/PELD/UFU (process number 88887.137914/2017-00) and CAPES/PNPD/UFVJM (process number 88887.352134/2019-00). We thank Dr. Renata Pacheco and Dr. Solange C. Augusto for their help with the identification of the ant and bee species, Fernanda Francisco de Paula for field assistance, three anonymous reviewers for substantial contributions, and Fabián Michelangeli for the taxonomic support.

References

- Aljbory Z., Chen M. (2018) Indirect plant defense against insect herbivores: a review. *Insect Science*, **25**, 2–23. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12436>
- Andrade J.C.A. (1984) Néctar em *Cecropia lyratiloba* Miq. var. *nana* Andr. & Car. (Cecropiaceae). *Rodriguésia*, **36**, 81–84. <https://doi.org/10.1590/2175-78601984365811>
- Barônio G.J., Del-Claro K. (2018) Increase in ant density promotes dual effects on bee behaviour and plant reproductive performance. *Arthropod-Plant Interactions*, **12**, 201–213. <https://doi.org/10.1007/s11829-017-9573-x>

- Bartimachi A., Neves J., Vasconcelos H.L. (2015) Geographic variation in the protective effects of ants and trichomes in a Neotropical ant–plant. *Plant Ecology*, **216**, 1083–1090.
<https://doi.org/10.1007/s11258-015-0491-7>
- Barton A.M. (1986) Spatial variation in the effect of ants on extrafloral nectary plant. *Ecology*, **67**, 495–504. <https://doi.org/10.2307/1938592>
- Bates D., Maechler M., Bolker B., Walker S. (2015) Fitting linear mixed-effects models using lme4. *Journal of Statistical Software*, **67**, 1–48. <https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01>
- Bizerril M.X.A., Vieira E.M. (2002) *Azteca* ants as antiherbivore agents of *Tococa formicaria* (Melastomataceae) in Brazilian Cerrado. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, **37**, 145–149. <https://doi.org/10.1076/snfe.37.2.145.8585>
- Bujan J., Kaspari M. (2017) Nutrition modifies critical thermal maximum of a dominant canopy ant. *Journal of Insect Physiology*, **102**, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2017.08.007>
- Calixto E.S., Lange D., Del-Claro K. (2018) Protection mutualism: an overview of ant-plant interactions mediated by extrafloral nectaries. *Oecologia Australis*, **22**, 410–425.
<https://doi.org/10.4257/oeco.2018.2204.05>
- Cardoso J.C.F., Deus F.F., Silva S.C.S., Oliveira P.E. (2017) Bow to the middle: reproductive system and style behaviour of *Tococa guianensis*, a widespread Melastomataceae from the Neotropics. *Plant Systematics and Evolution*, **304**, 259–267. <https://doi.org/10.1007/s00606-017-1473-0>
- Casique J.V., Silva E.F., Andrade E.H.A., Mastroberti A.A., Aguiar-Dias A.C.A. (2018) Anatomical analyses of floral and extrafloral secreting structures indicate the presence of nectaries and colleters in *Stanhopea grandiflora* Lindl. *Brazilian Journal of Botany*, **41**, 725–738.
<https://doi.org/10.1007/s40415-018-0469-5>
- 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**, 133–139.
<https://doi.org/10.1086/674101>

- Chamberlain S.A., Holland J.N. (2008) Density-mediated, context-dependent consumer-resource interactions between ants and extrafloral nectar plantas. *Ecology*, **89**, 1364–1374.
<https://doi.org/10.1890/07-1139.1>
- Chamberlain S.A., Holland J.N. (2009) Quantitative synthesis of context dependency in ant-plant protection mutualisms. *Ecology*, **90**, 2384-2392. <https://doi.org/10.1890/08-1490.1>
- Dátillo W., Aguirre A., Flores-Flores R. V., Fagundes R., Lange D., García-Chávez J., Del-Claro K., Rico-Gray V. (2015) Secretory activity of extrafloral nectaries shaping multitrophic ant-plant-herbivore interactions in an arid environment. *Journal of Arid Environments*, **114**, 104–109.
<https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2014.12.001>
- Dejean A., Delabie J.H.C., Cerdan P., Gibernau M., Corbara B. (2006) Are myrmecophytes always better protected against herbivores than other plants? *Biological Journal of the Linnean Society*, **89**, 91–98. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2006.00660.x>
- Díaz-Castelazo C., Rico-Gray V., Oliveira P.S., Cuautle M. (2004) Extrafloral nectary-mediated ant-plant interactions in the coastal vegetation of Veracruz, Mexico: Richness, occurrence, seasonality, and ant foraging patterns. *Écoscience*, **11**, 472–481.
<https://doi.org/10.1080/11956860.2004.11682857>
- Díaz-Castelazo C., Rico-Gray V., Ortega F., Ángeles G. (2005) Morphological and secretory characterization of extrafloral nectaries in plants of coastal Veracruz, Mexico. *Annals of Botany*, **96**, 1175–1189. <https://doi.org/10.1093/aob/mci270>
- Doak P., Wagner D., Watson A. (2007) Variable extrafloral nectary expression and its consequences in quaking aspen. *Canadian Journal of Botany*, **85**, 1–9. <https://doi.org/10.1139/b06-137>
- Falcão P.F., Melo-de-Pinna G.F.A., Leal I.R., Almeida-Cortez J.S. (2003) Morphology and anatomy of extrafloral nectaries in *Solanum stramonifolium* (Solanaceae). *Canadian Journal of Botany*, **81**, 859–864. <https://doi.org/10.1139/b03-083>
- Gaume L., Zacharias M., Borges R.M. (2005) Ant-plant conflicts and a novel case of castration

- parasitism in a myrmecophyte. *Evolutionary Ecology Research*, **7**, 435–452.
- Haridasan M., Araújo G.M. (2005) Perfil nutricional de espécies lenhosas de duas florestas semidecíduas em Uberlândia, MG. *Revista Brasileira de Botânica*, **3**, 295–303.
<https://doi.org/10.1590/S0100-84042005000200010>
- Hoeksema J.D., Bruna E.M. (2015) Context-dependent outcomes of mutualistic interactions. In: Bronstein J.L. (Ed) *Mutualism*. Oxford University Press, Oxford, UK:181–202.
<https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780199675654.003.0010>
- 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.
<https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2009.10.008>
- Hölldobler B., Wilson E.O. (1990) *The ants*. Belknap Press of Harvard University, Cambridge, UK: 732 pp. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-10306-7>
- Ibarra-Isassi J., Oliveira P.S. (2018) Indirect effects of mutualism: ant–treehopper associations deter pollinators and reduce reproduction in a tropical shrub. *Oecologia*, **186**, 691–701.
<https://doi.org/10.1007/s00442-017-4045-7>
- Izzo T.J., Vasconcelos H.L. (2002) Cheating the cheater: domatia loss minimizes the effects of ant castration in an Amazonian ant-plant. *Oecologia*, **133**, 200–205. <https://doi.org/10.1007/s00442-002-1027-0>
- Johansen D.A. (1940) *Plant microtechnique*. McGraw-Hill Book, New York, NY, USA: 523 pp.
- Malé P.J.G., Leroy C., Dejean A., Quilichini A., Orivel J. (2012) An ant symbiont directly and indirectly limits its host plant's reproductive success. *Evolutionary Ecology*, **26**, 55–63.
<https://doi.org/10.1007/s10682-011-9485-7>
- Malé P.J.G., Leroy C., Lusignan L., Petitclerc F., Quilichini A., Orivel J. (2015) The reproductive biology of the myrmecophyte, *Hirtella physophora*, and the limitation of negative interactions

- between pollinators and ants. *Arthropod-Plant Interactions*, **9**, 23–31.
<https://doi.org/10.1007/s11829-014-9352-x>
- Marazzi B., Bronstein J.L., Koptur S. (2013) The diversity, ecology and evolution of extrafloral nectaries: current perspectives and future challenges. *Annals of Botany*, **111**, 1243–1250.
<https://doi.org/10.1093/aob/mct109>
- McManus J.F.A. (1948) Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technology*, **23**, 99–108. <https://doi.org/10.3109/10520294809106232>
- Michelangeli F.A. (2003) Ant protection against herbivory in three species of *Tococa* (Melastomataceae) occupying different environments. *Biotropica*, **35**, 181–188.
<https://doi.org/10.1111/j.1744-7429.2003.tb00277.x>
- Michelangeli F.A. (2005) *Tococa (Melastomataceae)*. Flora Neotropica Monograph 98, New York, NY, USA: 114 pp.
- Michelangeli F.A., Goldenberg R., Almeda F., Judd W.S., Bécquer E.R., Ocampo G., Ionta G.M., Skean J.D., Majure L.C., Penneys D.S. (2019) Nomenclatural novelties in *Miconia* (Melastomataceae: Miconieae). *Brittonia* **71**, 82–121. <https://doi.org/10.1007/s12228-018-9546-0>
- Mondor E.B., Tremblay M.N., Messing R.H. (2006) Extrafloral nectary phenotypic plasticity is damage- and resource-dependent in *Vicia faba*. *Biology Letters*, **2**, 583–585.
<https://doi.org/10.1098/rsbl.2006.0527>
- Moraes S.C., Vasconcelos H.L. (2009) Long-term persistence of a Neotropical ant-plant population in the absence of obligate plant-ants. *Ecology*, **90**, 2375–2383. <https://doi.org/10.1890/08-1274.1>
- Nascimento E.A., Del-Claro K. (2010) Ant visitation to extrafloral nectaries decreases herbivory and increases fruit set in *Chamaecrista debilis* (Fabaceae) in a Neotropical savanna. *Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, **205**, 754–756.

<https://doi.org/10.1016/j.flora.2009.12.040>

Ness J.H. (2006) A mutualism's indirect costs: The most aggressive plant bodyguards also deter pollinators. *Oikos*, **113**, 506–514. <https://doi.org/10.1111/j.2006.0030-1299.14143.x>

O'Brien T.P., Feder N., McCully M.E. (1965) Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma*, **59**, 368-373. <https://doi.org/10.1007/BF01248568>

Oliveira P.S., Freitas A.V.L. (2004) Ant – plant – herbivore interactions in the Neotropical cerrado savanna. *Naturwissenschaften*, **91**, 557–570. <https://doi.org/10.1007/s00114-004-0585-x>

Pereira M.F., Trigo J.R. (2013) Ants have a negative rather than a positive effect on extrafloral nectaried *Crotalaria pallida* performance. *Acta Oecologica*, **51**, 49–53.

<https://doi.org/10.1016/j.actao.2013.05.012>

R Core Team (2017) *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria [online]. <https://www.R-project.org/>

Ranieri B.D., Silveira F.A.O., Franceschinelli E.V. (2013) Biologia floral e comportamento de polinizadores de *Tococa guianensis* Aubl. (Melastomataceae). *Lundiana*, **11**, 3–8.

Renner S.S. (1993) Phylogeny and classification of the Melastomataceae and Memecylaceae. *Nordic Journal of Botany*, **13**, 519–540. <https://doi.org/10.1111/j.1756-1051.1993.tb00096.x>

Rico-Gray V., Oliveira P.S. (2007) *The ecology and evolution of ant-plant interactions*. University of Chicago Press, Chicago, IL, USA: 331 pp.

<https://doi.org/10.7208/chicago/9780226713540.001.0001>

Rosumek F.B., Silveira F.A.O., Neves F.S., Barbosa N.P.U., Diniz L., Oki Y., Pezzini F., Fernandes G.W., Cornelissen T. (2009) Ants on plants: a meta-analysis of the role of ants as plant biotic defenses. *Oecologia*, **160**, 537–549. <https://doi.org/10.1007/s00442-009-1309-x>

Sass, J.E. (1951) *Botanical microtechnique*. Iowa State College Press, Ames, IA, USA: 391 pp.
<https://doi.org/10.5962/bhl.title.5706>

Schmid R. (1988) Reproductive versus extra-reproductive nectaries - historical perspective and

- terminological recommendations. *The Botanical Review*, **54**, 179–232.
- <https://doi.org/10.1007/BF02858528>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s10886-011-0052-z>
- Sobrinho T.G., Schoereder J.H., Rodrigues L.L., Collevatti R.G. (2002) Ant visitation (Hymenoptera: Formicidae) to extrafloral nectaries increases seed set and seed viability in the tropical weed *Triumfetta semitriloba*. *Sociobiology*, **39**, 353–368.
- Soltis P.S., Soltis D.E. (2004) The origin and diversification of Angiosperms. *American Journal of Botany*, **91**, 1614–1626. <https://doi.org/10.3732/ajb.91.10.1614>
- Tobe H., Hakki M.I., Langhammer L. (1989) Floral nectary in *Medinilla magnifica*, an Old World Melastomataceae. *Botanische Jahrbücher für Systematik*, **111**, 57–62.
- Trager M.D., Bhotika S., Hostetler J.A., Andrade G.V., Rodriguez-Cabal M.A., McKeon C.S., Osenberg C.W., Bolker B.M. (2010) Benefits for plants in ant-plant protective mutualisms: A meta-analysis. *PLOS ONE*, **5**. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014308>
- Varassin I.G., Penneys D.S., Michelangeli F.A. (2008) Comparative anatomy and morphology of nectar-producing Melastomataceae. *Annals of Botany*, **102**, 899–909.
- <https://doi.org/10.1093/aob/mcn180>
- Vogel S. (1997) Remarkable nectaries: structure, ecology, organophyletic perspectives I . Substitutive nectaries. *Flora*, **192**, 305–333. [https://doi.org/10.1016/S0367-2530\(17\)30798-3](https://doi.org/10.1016/S0367-2530(17)30798-3)
- Willmer P.G., Stone G.N. (1997) How aggressive ant-guards assist seed-set in *Acacia* flowers. *Nature*, **388**, 165–167. <https://doi.org/10.1038/40610>
- Yu D.W., Pierce N.E. (1998) A castration parasite of an ant-plant mutualism. *Proceedings of the Royal Society of London*, **265**, 375–382. <https://doi.org/10.1098/rspb.1998.0305>

Supporting Information

Table 1. Floral visitors of *Miconia tococa* (Melastomataceae) observed in each floral stage: B - buds and F - flowers, and in each study site: FEG - Fazenda Experimental do Glória and PS – Parque do Sabiá, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. LEIS codes refer to the Collection of Social Insects from the Federal University of Uberlândia (LEIS-UFU). * Buzz pollinators

Floral visitors	Floral stage	Site
Apidae		
Apinae		
<i>Apis mellifera</i> L. 1758	B	PS
<i>Bombus pauloensis</i> Friese 1913*	F	FEG
<i>Epicharis</i> sp.*	F	PS
<i>Eulaema nigrita</i> Lepeletier 1841*	F	PS
		PS,
<i>Scaptotrigona</i> sp.	F	FEG
<i>Trigona spinipes</i> (Fabricius 1793)	B	PS
		PS,
<i>Xylocopa frontalis</i> (Olivier 1789)*	F	FEG
Halictinae		
<i>Augochlora</i> spp.*	F	PS
		PS,
<i>Augochloropsis</i> spp.*	F	FEG
Formicidae		
Dolichoderinae		
<i>Dolichoderus bispinosus</i> (Olivier, 1792)	B	PS
Formicinae		
<i>Brachymyrmex</i> sp.LEIS5	B	PS,

		FEG
<i>Brachymyrmex</i> sp.LEIS12	B	FEG
<i>Camponotus atriceps</i> (Smith, 1858)	B	PS
<i>Camponotus blandus</i> (Smith, 1858)	B	PS
<i>Camponotus melanoticus</i> Emery, 1894	B	PS
		PS,
<i>Camponotus senex</i> (Smith, 1858)	B	FEG
<i>Camponotus</i> sp.LEIS33	B	FEG
<i>Camponotus</i> sp.LEIS72	B	FEG
<i>Camponotus</i> sp.LEIS75	B	FEG
Myrmicinae		PS,
<i>Cephalotes pusillus</i> (Klug, 1824)	B	FEG
<i>Crematogaster</i> sp.LEIS4	B	PS
<i>Crematogaster</i> sp.LEIS27	B,F	PS
<i>Nesomyrmex asper</i> (Mayr, 1887)	B	FEG
<i>Pheidole gertrudae</i> Forel, 1886	B	FEG
<i>Solenopsis</i> sp.LEIS17	B	FEG
Pseudomyrmecinae		
<i>Pseudomyrmex gracilis</i> (Fabricius, 1804)	B	PS
<i>Pseudomyrmex pallidus</i> (Smith, 1855)	B	FEG
		PS,
Vespidae	B	FEG

Capítulo 3 - Variações morfológicas, fisiológicas e reprodutivas da mirmecófita *Miconia tococa* em ambientes com diferentes condições de luminosidade

Resumo

Variações nas condições abióticas podem afetar o crescimento e a reprodução das plantas e gerar modificações morfológicas, fisiológicas e estruturais nos indivíduos. A luz é um dos fatores que mais afetam o desenvolvimento das plantas, por isso a capacidade de se adaptar a ambientes com diferentes níveis de luminosidade é essencial para a manutenção das espécies. *Miconia tococa* é uma mirmecófita com ampla distribuição geográfica que habita ambientes com variadas condições ambientais e apresenta variações morfológicas entre as populações. Para entender como *M. tococa* se adapta a esses diferentes ambientes, avaliei características morfológicas e fisiológicas, além da palatabilidade, crescimento e reprodução de indivíduos crescendo naturalmente em ambientes com diferentes níveis de luminosidade: interior e borda de mata de galeria, buscando responder às seguintes questões: (i) plantas de interior diferem das plantas de borda em quais características?; (ii) elas apresentam a mesma atratividade para herbívoros?; (iii) elas exibem o mesmo padrão de crescimento e potencial reprodutivo?; e (iv) esse padrão é o mesmo para populações diferentes?. Foram analisadas três populações de *M. tococa* nos municípios de Jataí, Uberlândia e Perdizes. A população de Jataí é colonizada por *Allomerus octoarticulatus*, uma espécie de formiga que nidifica exclusivamente em plantas mirmecófitas, mas que não ocorre nem Uberlândia nem em Perdizes. Em cada população foram avaliadas plantas que ocorriam no interior (menor luminosidade) e na borda (maior luminosidade) da floresta. As características morfofisiológicas avaliadas foram: área foliar, massa foliar específica (MFE), conteúdo relativo de água (CRA), densidade de tricomas, volume da domácea, teor de pigmentos (clorofilas *a* e *b* e carotenoides) e de carboidratos (açúcares solúveis totais – AST, polissacarídeos solúveis em água – PSA e amido). Para avaliar o grau de palatabilidade das plantas de borda e interior, foi realizado um experimento de preferência alimentar com a lagarta generalista *Spodoptera frugiperda*. Ainda, para avaliar as diferenças no investimento vegetativo e reprodutivo das três populações nos dois ambientes, foram mensuradas as seguintes medidas: altura total, número de folhas desenvolvidas e número de inflorescências. As folhas das plantas da borda da mata tiveram maior dureza, maior densidade de tricomas na face inferior e menor palatabilidade do que as do interior da mata. Fisiologicamente, as plantas de borda se mostraram metabolicamente mais ativas e mais produtivas, o que permitiu, nas populações sem interação com formigas obrigatórias, uma maior produção de inflorescências na borda do que no interior da mata. Já na população colonizada por formigas obrigatórias, a quantidade de luz no ambiente não afetou o

desempenho das plantas, indicando que a interação mutualista mantém as plantas menos vulneráveis às condições abióticas do meio.

Palavras-chave: luz, adaptabilidade, mutualismo, variação ambiental, formiga

Introdução

Espécies com ampla distribuição geográfica estão sujeitas a ambientes com variadas condições ambientais, como diferentes níveis de luminosidade, umidade e disponibilidade de nutrientes (Souza *et al.* 2018). Em plantas, essas variações ambientais estão geralmente associadas a modificações intraespecíficas em muitas características, tanto entre como dentro das populações (Valladares *et al.* 2006; Lázaro-Nogal *et al.* 2015; Souza *et al.* 2018). A variação entre os indivíduos pode ser gerada por variabilidade genética ou por plasticidade fenotípica, e é um importante mecanismo de adaptação aos diferentes ambientes e um meio de evitar extinções locais perante as mudanças climáticas (Heschel *et al.* 2004; Franks *et al.* 2014). Entre os fatores que influenciam a sobrevivência e o crescimento das plantas, a luz é considerada um dos mais limitantes, pois afeta diretamente a taxa de trocas gasosas e a síntese de fotoassimilados (Tang 1997; Valladares & Niinemets 2008).

Devido à relevância e à grande heterogeneidade da disponibilidade de luz nos ambientes, tanto espacial quanto temporal, todas as plantas apresentam certa capacidade de adaptação a distintos níveis de luminosidade por meio de variações morfológicas, fisiológicas e estruturais (Bloor & Grubb 2004; Rozendaal *et al.* 2006; Cai *et al.* 2008). Como as folhas são os órgãos fotossintéticos mais importantes, a modificação foliar é a forma mais eficiente de aclimatação e aproveitamento da luz em determinado ambiente (Rozendaal *et al.* 2006). De modo geral, um aumento em área foliar aumenta a interceptação de luz em ambientes com pouca luminosidade, enquanto que uma grande massa por área foliar amplia a capacidade fotossintética em ambientes com muita luz (Poorter *et al.* 2009). O parâmetro amplamente utilizado para determinar a massa por área foliar é a massa foliar específica (MFE), ou seu inverso, área foliar específica, e é determinado pela espessura e densidade foliar (Villar *et al.* 2013). A MFE é um indicador de características morfológicas e fisiológicas, como dureza foliar e capacidade fotossintética, sendo um fator chave para o crescimento das plantas

(Groom & Lamont 1999; Poorter *et al.* 2009). Além da MFE, outras características foliares podem ser fundamentais na adaptação de plantas a níveis diferentes de luminosidade, como a presença de tricomas, que atuam como um filtro contra radiação ultravioleta, e a concentração de clorofilas e carotenoides, que maximizam a captação de luz por unidade de área foliar (Gratani *et al.* 2006; Catoni *et al.* 2015; Xiao *et al.* 2017).

Todas modificações nas plantas para potencializar a captura de luz ou minimizar os danos causados pelo excesso de luminosidade buscam otimizar o processo de fotossíntese, que converte energia luminosa em energia química. A energia química produzida é conservada na forma de carboidratos (Lambers *et al.* 2008). Deste modo, o conteúdo de carboidratos, como açucares e amido, indica o potencial energético disponível para o crescimento e a reprodução das plantas (Weiner *et al.* 2009). Portanto, mudanças de luminosidade no ambiente podem alterar a fisiologia e anatomia das plantas, afetando o resultado reprodutivo dos indivíduos e, consequentemente, a manutenção de determinada população em um local (Poorter *et al.* 2019).

Além do crescimento e reprodução, os fatores abióticos, como a luz, podem alterar os mecanismos de defesa, direta ou indireta, contra herbívoros, o que também pode ter um efeito na manutenção das populações (Jones *et al.* 2017). De modo geral, ambientes mais ricos em recursos, como luz ou nutrientes, permitem um crescimento mais rápido, maior produtividade e investimento em defesas, como por exemplo, atrativos para formigas protetoras, como o néctar extrafloral (Coley *et al.* 1985; Trager & Bruna 2006; Endara & Coley 2011). Deste modo, diferentes níveis de luminosidade, além de induzir variações morfológicas e fisiológicas no indivíduo, podem alterar, direta ou indiretamente, o resultado de interações bióticas, como o mutualismo (Yamawo & Hada 2010; Hoeksema & Bruna 2015; Jones *et al.* 2017). Alguns estudos têm mostrado que as interações entre plantas e formigas são condicionais aos fatores abióticos do meio (Kersch & Fonseca 2005; Chamberlain & Holland 2009). Sendo assim, o efeito da presença da formiga para a planta

hospedeira pode variar de acordo com a disponibilidade de recursos presente no local (Folgarait & Davidson 1994; Trager & Bruna 2006; Jones *et al.* 2017).

Considerando as adaptações das plantas em resposta a diferentes condições abióticas, *Miconia tococa* (Desr.) Michelang. (Melastomataceae) é uma mirmecófita que pode ser usada como um interessante modelo para estudos de variações morfológicas e fisiológicas intraespecíficas, pois possui uma ampla distribuição geográfica, apresentando variações morfológicas entre as populações, e pode ocorrer em ambientes com condições abióticas diferentes dentro de uma mesma localidade, como sub-bosque de matas úmidas, borda de mata ou veredas (Michelangeli 2003, 2005). Além disso, *M. tococa* também apresenta interações de mutualismo com formigas ao longo de sua distribuição. A grande maioria das populações de *M. tococa* é habitada por formigas obrigatórias, ou seja, que nidificam apenas em mirmecófitas, como formigas dos gêneros *Azteca*, *Crematogaster* e *Allomerus*, que protegem sua hospedeira contra herbívoros (Bizerril & Vieira 2002; Michelangeli 2003; Moraes & Vasconcelos 2009). Entretanto, populações no limite sul da distribuição, onde uma parte do presente estudo foi desenvolvida, são associadas apenas a formigas não-obrigatórias, cuja associação é apenas facultativa e não é estabelecido um mutualismo protetivo efetivo (Moraes & Vasconcelos 2009). Apesar dos estudos desenvolvidos, pouco se sabe sobre os fatores que permitem a manutenção dessas populações sem um parceiro mutualista obrigatório (Moraes & Vasconcelos 2009; Bartimachi *et al.* 2015).

Dessa forma, para entender como *M. tococa* se adapta a ambientes com diferentes condições abióticas, foram avaliadas características morfológicas e fisiológicas, além da palatabilidade, crescimento e reprodução de indivíduos crescendo naturalmente em ambientes com diferentes níveis de luminosidade: interior e borda de mata de galeria, buscando responder às seguintes questões: (i) plantas de interior diferem das plantas de borda em quais características?; (ii) elas apresentam a

mesma atratividade para herbívoros?; (iii) elas exibem o mesmo padrão de crescimento e potencial reprodutivo?; e (iv) esse padrão é o mesmo para populações diferentes?.

Material e métodos

Locais de estudo

Foram analisadas três populações de *M. tococa* em matas de galeria nos municípios de Jataí, Uberlândia e Perdizes (Figura 1). A população de Jataí é colonizada por *Allomerus octoarticulatus* Forel, 1912, uma espécie de formiga que nidifica exclusivamente em plantas mirmecófitas, ou seja, formigas mutualistas obrigatórias, mas que não ocorre nem Uberlândia nem em Perdizes. Nestas duas últimas populações, formigas que nidificam no solo ou na vegetação arbórea eventualmente utilizam as domáceas de *M. tococa* como ninhos satélites (Moraes & Vasconcelos 2009). Em cada população foram avaliadas tanto plantas que ocorriam no interior (doravante plantas do interior) quanto na borda da floresta (doravante plantas da borda), as plantas do interior estavam entre 10 e 50 m da borda (Figura 2).

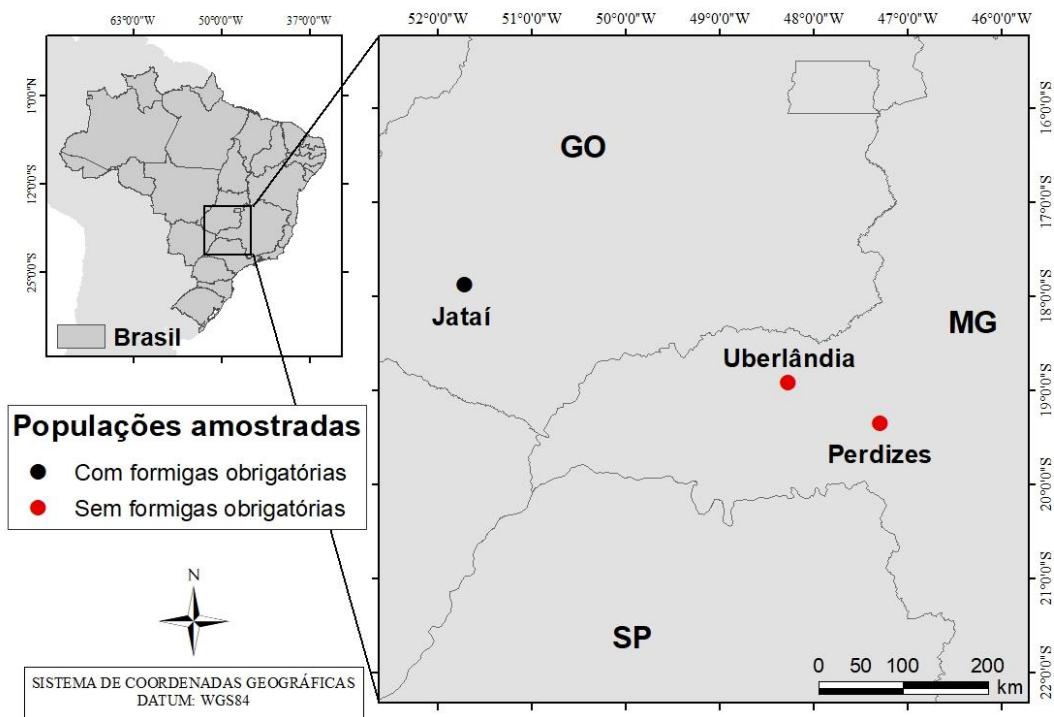


Figura 1. Localização das três populações da mirmecófita *Miconia tococa* amostradas.



Figura 2. Indivíduos de *Miconia tococa* naturalmente presentes no interior (A) e na borda de mata de galeria (B) no município de Uberlândia - MG.

Características morfológicas e fisiológicas

Foram comparados parâmetros morfológicos e parâmetros fisiológicos entre plantas de borda e de interior. Devido a limitações de acesso aos equipamentos necessários esta comparação foi restrita à população de Uberlândia. Foram avaliadas eventuais diferenças na área foliar, massa foliar específica (MFE), conteúdo relativo de água (CRA), densidade de tricomas, volume da domácea, teor de pigmentos (clorofilas *a* e *b* e carotenoides) e de carboidratos (açucares solúveis totais – AST, polissacarídeos solúveis em água – PSA e amido). Para análise de área foliar, densidade de tricomas e volume da domácea foram coletadas dez folhas de 18 indivíduos em cada ambiente, e para os demais parâmetros, como forma de padronização, foram coletadas as duas primeiras folhas expandidas de dez indivíduos em cada ambiente.

A área foliar (AF) foi estimada pela equação: $AF = 0,325 + 0,7323 \times (\text{comprimento da folha} \times \text{largura da folha})$ (Moraes & Vasconcelos 2009). A densidade de tricomas foi medida em seis seções de 1 cm² aleatoriamente posicionadas em cada folha, sendo três na superfície abaxial (inferior) e três na superfície adaxial (superior), sempre evitando as nervuras principais. Para cada superfície da folha foi calculada a média das três seções. Para o cálculo do volume da domácea foram medidas a altura, o comprimento e a largura da domácea com o auxílio de um paquímetro. O volume da domácea foi estimado pela equação: Volume = comprimento × largura × altura. Em seguida foi determinado o tamanho relativo da domácea, como: Volume relativo = volume / área foliar, para remover o efeito da área foliar que está correlacionado com o tamanho da domácea. Para esses parâmetros, foi calculada a média das folhas coletadas de cada planta.

Para mensurar a MFE e o CRA, foram cortados discos da lâmina foliar de 39,6 mm², que foram pesados em balança analítica logo após a coleta (peso fresco), hidratados por 24h, novamente pesados (peso hidratado) e, por fim, secos em estufa à 60°C por 48 horas e posteriormente pesados (peso seco). A MFE foi calculada pela equação: MFE = peso seco/área, e o CRA pela equação: CRA = [(peso fresco – peso seco) / (peso hidratado – peso seco)] × 100.

Para determinação do teor dos pigmentos clorofila A (CLA), clorofila B (CLB) e carotenoides (CAROT), assim como o teor de clorofilas totais (CLT) e as proporções clorofila A/clorofila B (CLA/CLB) e clorofilas totais/carotenoides (CLT/CAROT) foram seguidos o protocolo e os cálculos estabelecidos por Lichtenthaler & Wellburn (1983), utilizando-se acetona 80% e realizando-se a leitura do material em espectrofotômetro de luz visível (espectrofotômetro BioSpectro, SP-220, São Paulo, Brasil) nos comprimentos de onde 646, 470 e 663 nm. Para dosagem de carboidratos foi utilizado método colorimétrico fenol-ácido sulfúrico (Dubois *et al.* 1956; Chow & Landhäusser 2004) e glicose como padrão.

Para avaliar se as características mensuradas diferem entre os indivíduos crescendo em ambientes com níveis diferentes de luminosidade (borda e interior), foram realizados testes *t* para duas amostras sempre que possível. Os dados de MFE, CLA/CLB, CLT/CAROT e PSA não atenderam as premissas de normalidade e homocedasticidade do teste e assim foram analisados através do teste de Mann-Whitney. Todas as análises foram realizadas no software R (R Core Team 2017).

Experimento de palatabilidade

Para avaliar o grau de palatabilidade das plantas de borda e interior, foi realizado um experimento de preferência alimentar com a lagarta generalista *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797). Para tanto, foram realizados dois experimentos: um com folhas jovens (primeiro nó) e outro com folhas maduras (segundo nó), sendo que cada experimento foi replicado 35 vezes. Em cada experimento foram oferecidos dois fragmentos foliares de 3 x 3 cm (9 cm²), sendo um fragmento de planta da borda e outro de planta do interior, para uma lagarta de 6º ou 7º instar apta a consumir o recurso alimentar (Figura 3). Após 24h, os dois fragmentos foram retirados, fotografados e a área foliar consumida foi mensurada com o auxílio do software *Image J*.

Para analisar se houve diferença no consumo de cada lagarta (palatabilidade) entre folhas provindas de plantas de interior e borda, foi utilizado um teste *t* pareado para cada experimento separadamente (com folhas jovens e maduras), considerando a porcentagem de consumo de cada fragmento foliar. A análise foi realizada no software R (R Core Team 2017).

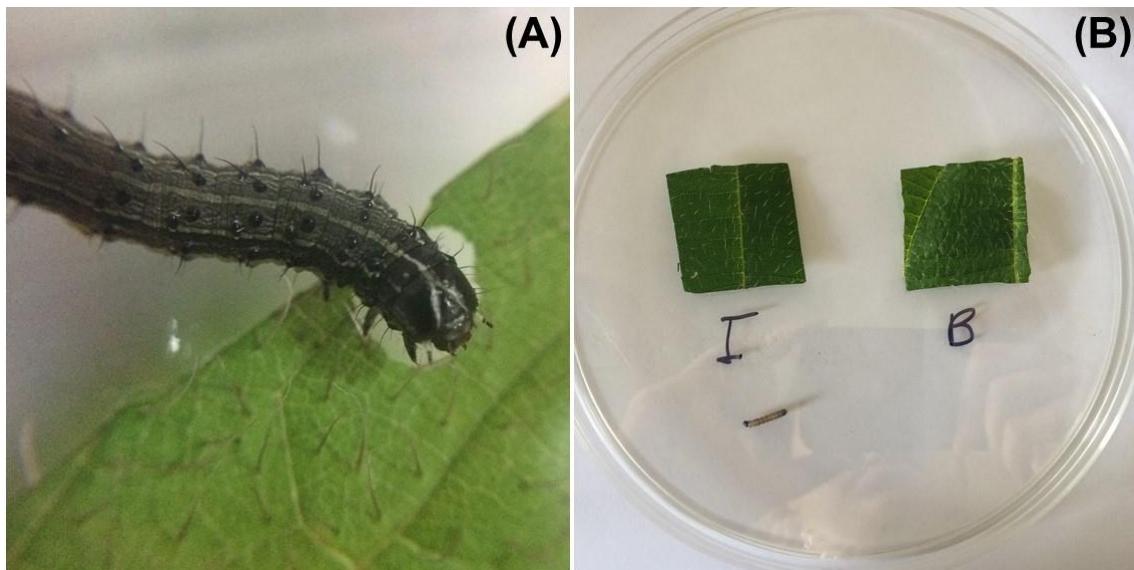


Figura 3. Experimento de preferência alimentar. (A) Lagarta *Spodoptera frugiperda*. (B) Placa de petri utilizada no experimento, contendo dois fragmentos foliares de *Miconia tococa*, um de planta do interior da mata e outro de planta da borda da mata.

Tamanho das plantas, herbivoria e investimento reprodutivo

Foram avaliadas as diferenças no investimento vegetativo (número de folhas e altura), reprodutivo (número de inflorescências) e no nível de dano por herbívoros entre plantas de borda e interior das populações de Jataí, Uberlândia e Perdizes. Foram selecionados de 20 a 45 indivíduos em cada ambiente (interior e borda), conforme o número de plantas disponíveis em cada local. Dos indivíduos selecionados, foram mensuradas as seguintes medidas: altura total, número de folhas desenvolvidas (com domácea) e número de inflorescências. As coletas foram realizadas entre os meses de agosto e outubro, que é o período reprodutivo de *M. tococa* nas áreas estudadas (Antunes &

Ribeiro 1999). Dentre as plantas amostradas, 10 a 20 foram selecionadas para mensurar a área foliar danificada. De cada um desses indivíduos, foram coletadas dez folhas, das quais foram tomadas as medidas de comprimento total e largura total com o auxílio de uma régua, e a área perdida foi estimada com o auxílio de um filme plástico gradeado com precisão de 1 cm².

Para avaliar se o número de folhas e a herbivoria diferem entre os ambientes e as populações, foram usados dois modelos lineares (LM). No primeiro, o número de folhas foi transformado por uma função logarítmica para atender as premissas do teste e os fatores população, ambiente e altura foram testados como variáveis preditoras, assim como todas as possíveis interações. Para simplificar o modelo, as interações não significativas foram eliminadas uma a uma, sem que houvesse prejuízo ao modelo, restando apenas a interação entre ambiente e altura, além das variáveis mencionadas. No segundo LM, os dados de herbivoria foram transformados em logit (Warton & Hui 2011) para atender as premissas do teste e os fatores população e ambiente foram testados como variáveis preditoras, assim como interação entre esses fatores. Quando necessário, comparações múltiplas a posteriori foram realizadas pela função ‘glht’ no pacote ‘multicomp’ (Hothorn *et al.* 2008; R Core Team 2017).

Para avaliar se o número de inflorescências difere entre os ambientes e as populações, foi usado um modelo linear generalizado (GLM) com distribuição de erros *Poisson*, considerando o número de inflorescência como variável dependente, os fatores população e ambiente como variáveis preditoras e o número de folhas como covariável. Porém, devido a uma superdispersão dos dados, foi utilizado um GLM *Quasi-Poisson* com essas mesmas variáveis. Devido a interação entre os fatores população e ambiente, foram testados modelos (GLM) para cada uma das populações, também considerando o fator ambiente como variável preditora e o número de folhas como covariável. Todas as análises foram realizadas no software R (R Core Team 2017).

Resultados

Características morfológicas

Para a população de Uberlândia, plantas sob diferentes níveis de luminosidade (interior e borda da mata) não apresentaram diferença de área foliar ($t = 2,01$; $gl = 33$; $p = 0,053$). A massa foliar específica (MFE) das plantas da borda foi em média 260% maior que das plantas do interior ($U = 100$; $N_b = 10$; $N_i = 10$; $p < 0,001$), porém não houve diferenças quanto ao conteúdo relativo de água (CRA) ($t = 0,64$; $gl = 18$; $p < 0,95$) e nem quanto ao volume das domáceas ($t = 1,705$; $gl = 34$; $p = 0,09$). Houve diferença na densidade de tricomas da face inferior (abaxial; $t = 4,84$; $gl = 34$; $p < 0,001$), sendo que as plantas de borda apresentaram em média 50% mais tricomas que plantas do interior, e não houve diferença na densidade de tricomas na face superior (adaxial; $t = 0,05$; $gl = 34$; $p = 0,62$) (Figura 4).

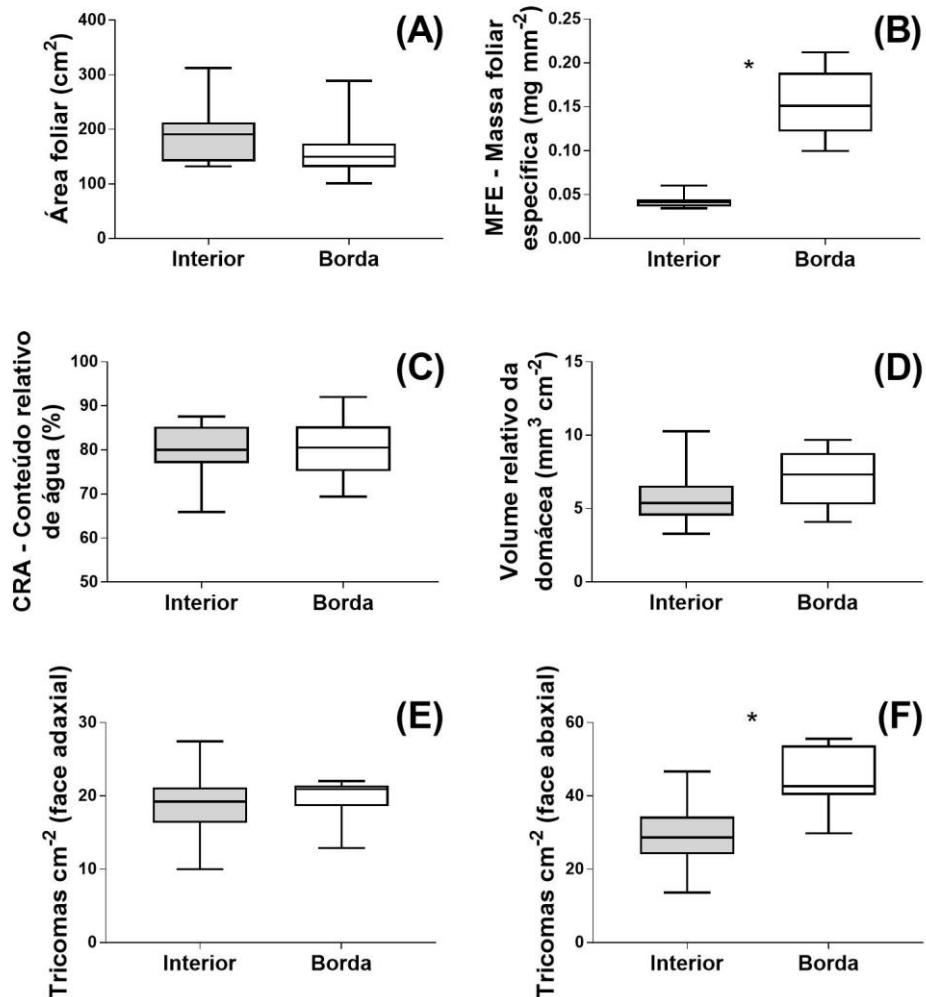


Figura 4. Área foliar (A), massa foliar específica - MFE (B), conteúdo relativo de água - CRA (C), volume relativo da domácea (D), e densidade de tricomas na face superior (E) e inferior (F) de *Miconia tococa* em ambientes com diferentes níveis de luminosidade (borda e interior da floresta) em população de Uberlândia – MG. Asteriscos representam médias diferentes entre os tratamentos a 5% de significância.

Características fisiológicas

As plantas de interior apresentaram teor de clorofila A em média 95% maior que as plantas de borda (CLA; $t = 6,31$; gl = 18; $p < 0,001$), teor de clorofila B em média 100% maior (CLB; $t = 7,89$; gl = 18; $p < 0,001$), clorofilas totais em média 98% maior (CLT; $t = 6,88$; gl = 18; $p < 0,001$) e teor de carotenoides em média 72% maior ($t = 6,6$; gl = 18; $p < 0,001$). Quanto às proporções dos

pigmentos, as plantas dos dois ambientes apresentaram a mesma razão CLA:CLB ($U = 59$; $N_{\text{borda}} = 10$; $N_{\text{interior}} = 10$; $p = 0,5$), mas a razão CLT:Carotenoides foi em média 16% maior nas plantas do interior da mata ($U = 22$; $N_b = 10$; $N_i = 10$; $p = 0,03$) (Figura 5).

Quanto aos carboidratos presentes nas folhas de plantas dos dois ambientes, as plantas da borda apresentaram teor de açúcares solúveis totais 50% maior ($t = 5,39$; $gl = 18$; $p < 0,001$) e teor de amido 36% maior que as plantas do interior ($t = 3,37$; $gl = 18$; $p < 0,01$), enquanto que o teor de polissacarídeos solúveis em água não diferiu entre plantas de borda e interior ($U = 34$; $N_b = 10$; $N_i = 10$; $p = 0,23$) (Figura 5).

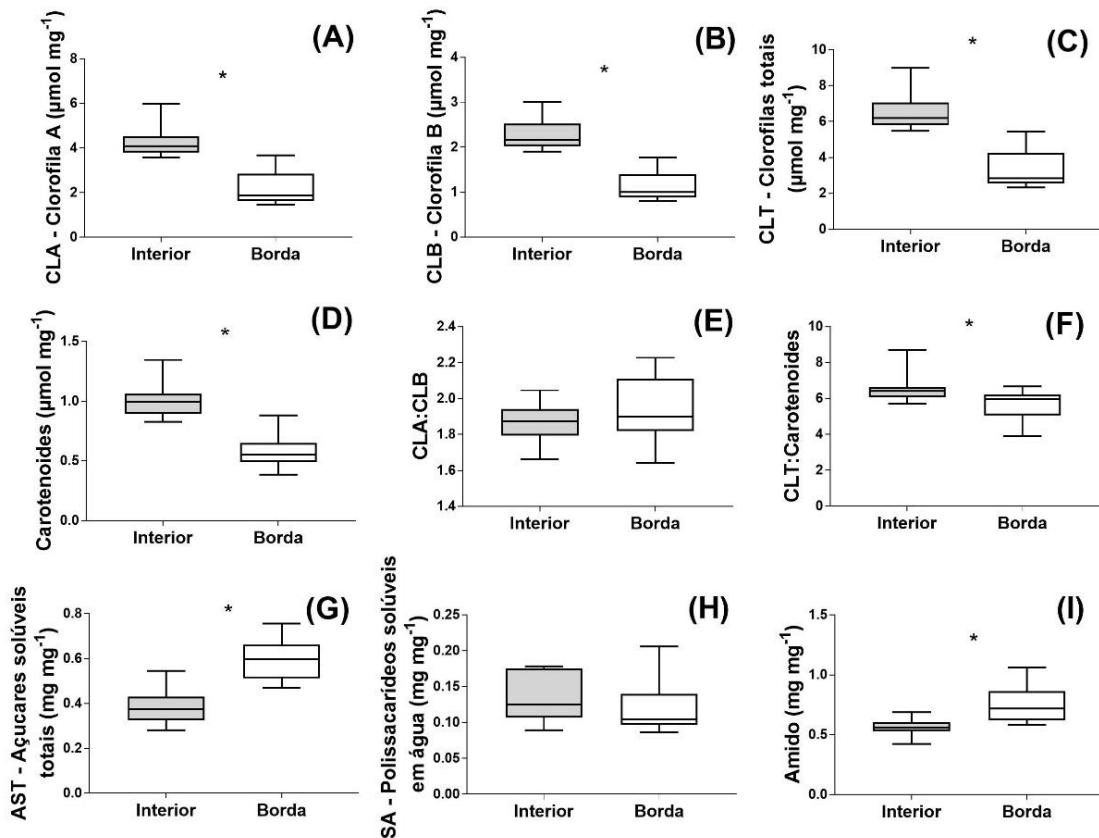


Figura 5. Teor de clorofila A (A), de clorofila B (B), de clorofilas totais (C) e de carotenoides (D), relação CLA:CLB (E), relação CLT:Carotenoides (F), teor de açúcares solúveis totais – AST (G), polissacarídeos solúveis em água – PSA (H) e amido (I) em plantas de *Miconia tococa* em ambientes com diferentes níveis de luminosidade (interior e borda da mata de galeria) em população de Uberlândia – MG. Asteriscos representam médias diferentes entre os tratamentos a 5% de significância.

Experimento de palatabilidade

O experimento de preferência alimentar com lagartas generalistas mostrou que não houve diferenças no consumo de folhas jovens entre folhas oriundas de plantas da borda ou do interior ($t = 1,61$; $gl = 30$; $p = 0,18$). Porém, as folhas maduras de plantas do interior foram significativamente mais consumidas (em média 26% a mais de consumo) do que as folhas maduras de plantas da borda ($t = 4,61$; $gl = 30$; $p < 0,001$) (Figura 6).

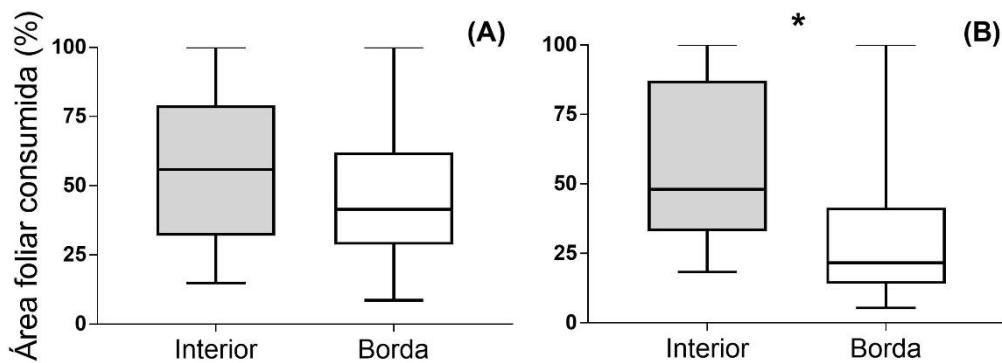


Figura 6. Experimento de palatabilidade de folhas de *Miconia tococa* pela lagarta generalista *Spodoptera frugiperda*. Porcentagem de área foliar consumida para folhas de jovens (A) e maduras (B) provenientes de plantas crescendo em ambientes de interior e borda de mata no município de Uberlândia – MG. O asterisco representa médias diferentes entre os tratamentos a 5% de significância.

Tamanho das plantas, herbivoria e investimento reprodutivo

A análise sobre a relação entre altura e número de folhas, mostrou que há diferenças no número de folhas entre plantas de diferentes populações ($F_{(2,150)} = 43,74$; $p < 0,001$), sendo que as plantas de Jataí apresentaram proporcionalmente (isto é, relativo à sua altura) mais folhas do que as plantas das outras duas populações (Teste de Tukey; $p < 0,001$). Não houve diferença significativa no número de folhas entre plantas de borda e interior ($F_{(1,150)} = 1,33$; $p = 0,25$), porém houve uma interação entre o ambiente e co-variável altura ($F_{(1,150)} = 11,31$; $p < 0,001$), já que o

incremento no número de folhas em relação à altura da planta tendeu a ser maior entre plantas da borda do que entre as de interior (Figura 7).

A herbivoria diferiu entre as populações ($F_{(2,113)} = 13,45$; $p < 0,001$), sendo maior nas populações de Uberlândia e Perdizes do que na população de Jataí, que é colonizada por formigas obrigatórias (Teste de Tukey; $p < 0,001$; Figura 8a), porém não diferiu entre os ambientes ($F_{(1,113)} = 0,27$; $p = 0,6$) (Figura 8a). A média de inflorescências por planta diferiu entre as populações ($\chi^2 = 14,47$; $gl = 2$; $p < 0,001$), sendo maior para a população de Jataí do que para a população de Uberlândia, considerando os dois ambientes amostrados, a população de Perdizes não diferiu das outras duas (Teste de Tukey; $p < 0,001$; Figura 8b). Também houve diferença na média de inflorescências entre os ambientes ($\chi^2 = 67,76$; $gl = 1$; $p < 0,001$) e uma interação entre esses dois fatores ($\chi^2 = 29,61$; $gl = 2$; $p < 0,001$), sendo que a diferença entre os ambientes foi significativa para as populações de Uberlândia ($\chi^2 = 50,6$; $gl = 1$; $p < 0,001$) e de Perdizes ($\chi^2 = 7,22$; $gl = 1$; $p < 0,01$) (Figura 8b), e não para a população de Jataí ($\chi^2 = 1,64$; $gl = 1$; $p < 0,2$). A covariável número de folhas também afetou o número de inflorescências ($\chi^2 = 206,22$; $gl = 1$; $p < 0,001$; Figura 9).

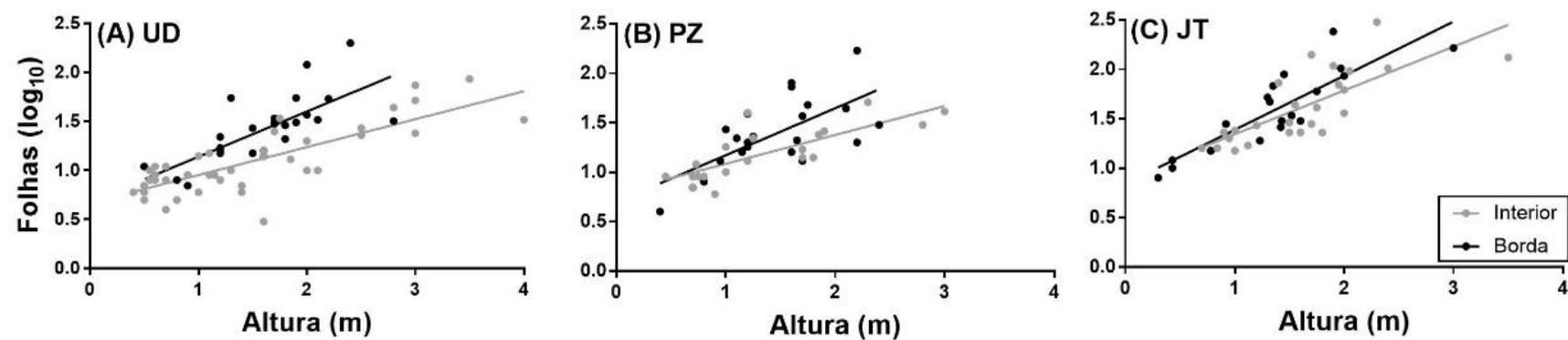


Figura 7. Relação entre altura e número de folhas para plantas de *Miconia tococa* em dois ambientes (borda e interior da mata) para três populações: (A) UD - Uberlândia, (B) PZ - Perdizes e (C) JT - Jataí. A população de Jataí é colonizada por formigas obrigatórias (*Allomerus octoarticulatus*), enquanto que as outras duas populações apresentam interações apenas com formigas não-obrigatórias.

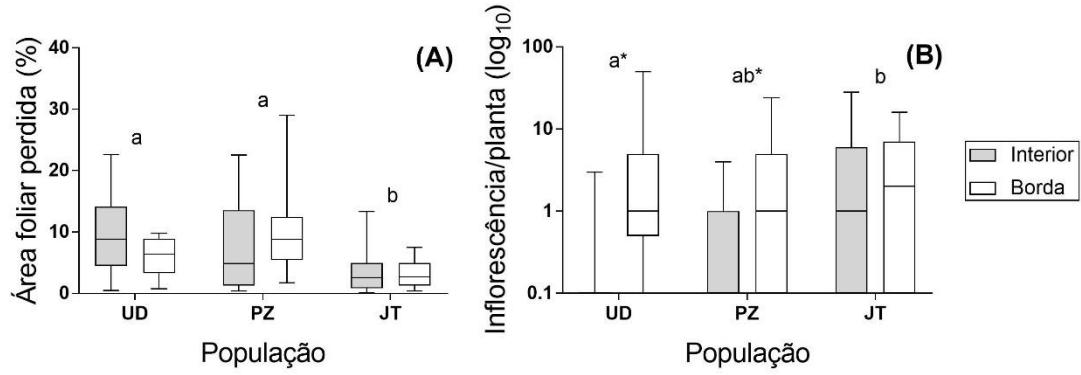


Figura 8. Herbivoria (A) e número de inflorescências por planta (B) em três populações de *Miconia tococa* (Uberlândia - UD, Perdizes - PZ e Jataí - JT) sob dois ambientes com diferentes níveis de luminosidade (interior e borda da mata). As letras minúsculas representam médias diferentes entre as populações e os asteriscos representam médias diferentes entre os ambientes a 5% de significância.

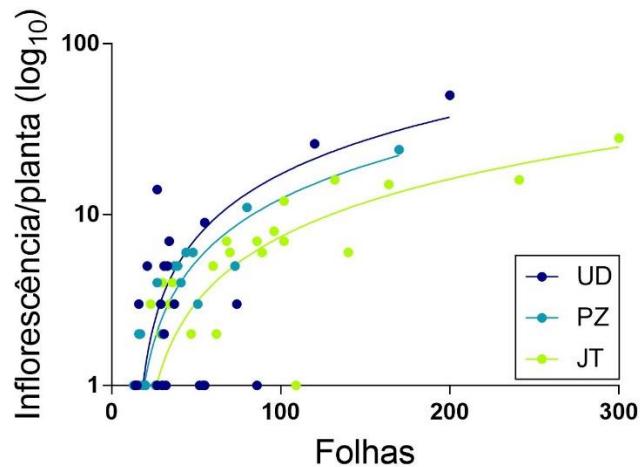


Figura 9. Relação entre número de folhas e número de inflorescências por plantas de *Miconia tococa*.

Discussão

Plantas de *Miconia tococa* crescendo em ambientes com diferentes níveis de luminosidade apresentaram variações tanto morfológicas como fisiológicas. As folhas das plantas da borda da mata tiveram maior dureza (maior MFE) e maior densidade de tricomas na face inferior do que as folhas do interior da mata, o que pode explicar a baixa palatabilidade das folhas de borda. Fisiologicamente,

as plantas de borda se mostraram metabolicamente mais ativas (maior concentração de açúcares solúveis) e mais produtivas (maior estoque de amido). Como esperado, a população de Jataí, colonizada por formigas mutualistas obrigatórias, apresentou menor herbivoria que as outras duas populações, Uberlândia e Perdizes. Entre essas populações também houve diferenças no investimento vegetativo e reprodutivo. As plantas de Jataí apresentaram maior número de folhas e maior número de inflorescências por planta. Dentro de cada população, a intensidade luminosa do ambiente afetou positivamente a reprodução apenas nas populações de Uberlândia e Perdizes. Para Jataí, o número de inflorescências não diferiu entre os ambientes.

Características morfológicas

A massa foliar específica (MFE) é um parâmetro muito variável, tanto entre espécies como dentro da mesma espécie, sendo que o fator ambiental que mais afeta a MFE é a luz (Rozendaal *et al.* 2006; Poorter *et al.* 2009). A capacidade de modificar a MFE de acordo com a intensidade luminosa do ambiente pode ser fundamental para o *fitness* das plantas (Poorter *et al.* 2009; Villar *et al.* 2013). Em ambientes com baixa irradiância, uma menor MFE é benéfica pois permite uma maior extensão foliar para interceptação de luz, com menor investimento em biomassa, enquanto que uma grande biomassa por área (elevada MFE) aumenta a capacidade fotossintética em ambientes com muita luz (Niinemets *et al.* 1998). Além de ampliar a capacidade fotossintética, uma grande MFE está associada a alta resistência e baixa palatabilidade, atuando então, como um mecanismo de defesa mecânico contra herbívoros (Pérez-Harguindeguy *et al.* 2003; Poorter *et al.* 2009). Assim, como esperado, plantas de *M. tococa* crescendo em ambiente com maior disponibilidade de luz, borda da mata, apresentaram maior MFE que plantas de ambiente sombreado, interior da mata. A grande magnitude da variação (MFE 260% maior nas folhas da borda) indica que essa espécie tem uma alta capacidade de adaptação às diferentes condições de luminosidade dos ambientes. Rozendaal *et al.* (2006), avaliando a área foliar específica de 38 espécies arbóreas tropicais, também encontraram que folhas de sol apresentam maior massa seca por unidade de área foliar, porém, em média, essa

variação foi de apenas 30%. Essa grande variabilidade de MFE em *M. tococa* pode contribuir para a ampla distribuição geográfica da espécie, pois permite que os indivíduos se adaptem a locais com diferentes condições ambientais.

Além da MFE, outros caracteres morfológicos também podem ser importantes para o estabelecimento de uma planta em determinado ambiente. A área foliar é um importante parâmetro, principalmente para plantas de ambientes sombreados, pois afeta diretamente a captura de luz (Bragg & Westoby 2002). Assim, muitas espécies apresentam folhas maiores quando estão em ambientes com pouca luz (Weijschedé *et al.* 2006; Poorter & Rozendaal 2008). Em *M. tococa*, houve apenas uma tendência ($p = 0,053$) das folhas do interior da mata serem maiores que as da borda, o que pode evidenciar uma baixa capacidade dessa espécie de modificar esse parâmetro em diferentes condições de luminosidade, ou pode indicar que outras características, como a MFE, são mais importantes para garantir o estabelecimento do indivíduo nesse ambiente.

Os tricomas representam estruturas superficiais dinâmicas que protegem os órgãos vegetais de estresses bióticos e abióticos (Karabourniotis *et al.* 2020). A camada de tricomas forma uma barreira protetora contra patógenos e aumenta a resistência das folhas contra herbívoros, o que influencia a oviposição de insetos e a alimentação de uma ampla gama de herbívoros (Peter *et al.* 1995; Kortekamp *et al.* 1999; Vermeij 2015). Quanto aos estresses abióticos, em ambientes secos e com alta intensidade luminosa, a camada de tricomas pode ser essencial para reduzir a perda de água, a fotoinibição, a temperatura da lâmina foliar e os danos causados pela radiação ultravioleta-B (Bickford 2016; Xiao *et al.* 2017). Devido às características físicas e químicas dos tricomas, eles atuam como refletores de luz e controlam o equilíbrio energético das folhas, afetando, consequentemente, as trocas gasosas (Bickford 2016; Karabourniotis *et al.* 2020). Deste modo, esperava-se que as plantas da borda apresentassem maior densidade de tricomas que plantas do interior, pois estão expostas a condições ambientais mais adversas. Essa diferença foi observada apenas para a face inferior das folhas, o que pode estar relacionado com a proteção dos estômatos

contra a perda de água e a radiação intensa, já que são mais numerosos na face abaxial (Turner 1970; Grammatikopoulos *et al.* 1994). Alguns estudos apontam para uma redução na densidade de tricomas ao longo da expansão foliar, sendo essa redução maior para a face adaxial (Karabourniotis & Bornman 1999), o que pode ser um indício de que os tricomas da face adaxial em folhas maduras não desempenhem funções essenciais, e, portanto, não são fundamentais para a adaptabilidade das plantas. Entretanto mais estudos são necessários para avaliar a função dos tricomas na face superior das folhas.

Características fisiológicas

O aumento da concentração de clorofila por unidade de área foliar, principalmente de clorofila B, maximiza a captação de luz solar e pode ser um fator importante para plantas de ambientes sombreados, onde o recurso luz é limitante (Gratani *et al.* 2006; Catoni *et al.* 2015). Já em ambientes com alta incidência solar, o aumento do teor de carotenoides melhora a dissipação da energia e reduz os danos causados ao aparelho fotossintético pelo excesso de luz (fotoinibição) (Demmig-Adams & Adams 1996; Catoni *et al.* 2015). Para *M. tococa*, nas folhas do interior da mata houve um maior teor de clorofilas totais, porém a proporção CLA:CLB não diferiu entre os ambientes avaliados, indicando que as plantas de sombra não investem mais em clorofila B como forma de otimizar a captação de luz. Houve também uma diferença na proporção CLT:Carotenoides, sendo menor para as plantas de borda, indicando que nessas há um maior investimento em pigmentos carotenoides em relação ao teor de clorofilas totais do que nas plantas do interior. Apesar disso, as plantas de interior ainda possuem maior concentração de carotenoides por unidade de massa foliar que plantas da borda. Essa diferença pode ser explicada pelo papel desses pigmentos, além da fotoproteção, na captação de luz em ambientes sombreados (Sánchez-Gómez *et al.* 2006).

A luz captada pelas folhas é convertida e armazenada na forma de carboidratos (Lambers *et al.* 2008). Os açúcares solúveis de baixa complexidade (AST, como glicose, frutose e galactose) são prontamente utilizados no metabolismo e são um indicativo de alta taxa metabólica, como atividade

respiratória e fotossintética. Os polissacarídeos solúveis em água (PSA) são carboidratos mais complexos e com função estrutural, como a pectina, que podem contribuir para uma maior densidade do tecido vegetal. Já o excedente de energia química produzida é armazenado, principalmente, na forma de amido (Bhatla & A. Lal 2018). Em *M. tococa*, o aumento da luminosidade gera uma maior taxa fotossintética, evidenciada pela maior concentração de AST, tornando as plantas mais produtivas, como demonstrado pelo maior teor de reserva de amido.

Experimento de palatabilidade

Diversas características morfológicas e químicas dos vegetais determinam a preferência alimentar de cada herbívoro, que pode variar também de acordo com a identidade e o hábito alimentar de cada organismo (Pérez-Harguindeguy *et al.* 2003; Peeters *et al.* 2007). Dentre os parâmetros morfológicos, a dureza foliar é um dos que mais afetam a palatabilidade, principalmente em relação aos insetos mastigadores. Folhas mais duras são evitadas por apresentarem uma maior resistência ao corte, e consequentemente maior gasto energético para o consumo (Peeters *et al.* 2007; Poorter *et al.* 2009). Como já mencionado anteriormente, a MFE é utilizada como um estimador da dureza foliar, assim, para *M. tococa*, as folhas maduras do interior da mata foram consideradas mais tenras, o que pode ter levado a um maior consumo pelas lagartas no experimento de palatabilidade em relação às folhas de borda. Folhas mais jovens possuem menor dureza do que folhas maduras, desse modo, essa característica pode não ter sido um fator decisivo na palatabilidade das folhas.

Outro fator que pode ter influenciado a preferência das lagartas no experimento com folhas maduras é a densidade de tricomas na face abaxial dos fragmentos foliares, que foi maior nas folhas de borda. Muitas lagartas ficam posicionadas na face inferior das folhas e os tricomas podem dificultar a locomoção desses insetos e o consumo foliar (Lill *et al.* 2009; Despland 2019).

Tamanho das plantas, herbivoria e investimento reprodutivo

Formigas mutualistas obrigatórias protegem suas hospedeiras contra o ataque de herbívoros (Heil & McKey 2003). Estudos já demonstraram essa interação protetiva para *M. tococa* e várias espécies de formigas (Michelangeli 2005; Moraes & Vasconcelos 2009). Entretanto, em populações sem formigas obrigatórias, as formigas não-obrigatórias não são eficientes em reduzir as taxas de herbivoria das plantas (Bartimachi *et al.* 2015). Assim, como esperado, no presente estudo a herbivoria foi menor em Jataí do que nas outras duas populações. Dentro de cada população, a herbivoria não diferiu entre os ambientes, apesar do experimento de palatabilidade ter demonstrado que folhas do interior da mata são mais palatáveis que folhas da borda. Portanto, outros fatores podem estar influenciando as taxas de herbivoria, como a densidade de herbívoros, fatores abióticos, ou até mesmo fatores estocásticos (Barber & Marquis 2011).

Em uma recente meta-análise, Poorter *et al.* (2019) avaliaram a plasticidade de 70 características anatômicas, morfológicas, fisiológicas, químicas, crescimento vegetativo e reprodução de plantas crescendo em ambientes com diferentes níveis de luminosidade. De modo geral, o aumento de luminosidade gera um aumento da taxa fotossintética, o que leva a um aumento do crescimento vegetativo e, consequentemente, do esforço reprodutivo. O crescimento vegetativo pode ser o resultado de muitos fatores, porém o potencial reprodutivo é determinado basicamente pelo tamanho da planta (Weiner *et al.* 2009). Apesar das plantas de borda e interior não terem diferido em número de folhas, a maior MFE e o maior conteúdo de carboidratos das folhas de borda são um indicativo de que as plantas de borda apresentam um maior potencial energético disponível para reprodução que às plantas de interior (Weiner *et al.* 2009). Assim, em *M. tococa* houve um efeito positivo da luminosidade no potencial fotossintético, e consequentemente, na reprodução dos indivíduos nas populações de Uberlândia e Perdizes. Nessas populações, como as inflorescências são raras em plantas do interior da mata, as plantas de borda podem estar garantindo a variabilidade genética, e assim, a manutenção das populações nesses locais. Já para a população de Jataí,

colonizada por *A. octoarticulatus*, a restrita quantidade de luz no interior da mata não reduziu a reprodução dos indivíduos, um indício de que a colonização por formigas mutualistas garante os recursos energéticos necessários para a reprodução nesses ambientes.

Conclusão

A mirmecófita *Miconia tococa* demonstrou a capacidade de ocupar ambientes com diferentes condições abióticas por meio de variações morfológicas e fisiológicas. Em ambientes com maior intensidade luminosa, as plantas se mostraram mais produtivas, o que permitiu uma maior produção de inflorescências. Nas populações sem interação com formigas obrigatórias, esse incremento parece ser fundamental para a manutenção e a reprodução da população. Na população colonizada por formigas obrigatórias, a quantidade de luz no ambiente não afetou o desempenho das plantas, indicando que a interação mutualista mantém as plantas menos vulneráveis às condições abióticas do meio.

Referências

- Antunes N.B., Ribeiro J.F. (1999) Aspectos fenológicos de seis espécies vegetais em matas de galeria do Distrito Federal. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **34**:1517–1527.
<https://doi.org/10.1590/S0100-204X1999000900001>
- Barber N.A., Marquis R.J. (2011) Leaf quality, predators, and stochastic processes in the assembly of a diverse herbivore community. *Ecology* **92**:699–708. <https://doi.org/10.1890/10-0125.1>
- Bartimachi A., Neves J., Vasconcelos H.L. (2015) Geographic variation in the protective effects of ants and trichomes in a Neotropical ant–plant. *Plant Ecology* **216**:1083–1090.
<https://doi.org/10.1007/s11258-015-0491-7>
- Bhatla S.C., A. Lal M. (2018) *Plant Physiology, Development and Metabolism*. Springer Singapore, Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-2023-1>

- Bickford C.P. (2016) Ecophysiology of leaf trichomes. *Functional Plant Biology* **43**:807–814.
<https://doi.org/10.1071/FP16095>
- Bizerril M.X.A., Vieira E.M. (2002) *Azteca* ants as antiherbivore agents of *Tococa formicaria* (Melastomataceae) in Brazilian Cerrado. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* **37**:145–149. <https://doi.org/10.1076/snfe.37.2.145.8585>
- Bloor J.M.G., Grubb P.J. (2004) Morphological plasticity of shade-tolerant tropical rainforest tree seedlings exposed to light changes. *Functional Ecology* **18**:337–348.
<https://doi.org/10.1111/j.0269-8463.2004.00831.x>
- Bragg J.G., Westoby M. (2002) Leaf size and foraging for light in a sclerophyll woodland. *Functional Ecology* **16**:633–639. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2435.2002.00661.x>
- Cai Z.Q., Poorter L., Han Q., Bongers F. (2008) Effects of light and nutrients on seedlings of tropical *Bauhinia* lianas and trees. *Tree Physiology* **28**:1277–1285.
<https://doi.org/10.1093/treephys/28.8.1277>
- Catoni R., Granata M.U., Sartori F., Varone L., Gratani L. (2015) *Corylus avellana* responsiveness to light variations: morphological, anatomical, and physiological leaf trait plasticity. *Photosynthetica* **53**:35–46. <https://doi.org/10.1007/s11099-015-0078-5>
- Chamberlain S.A., Holland J.N. (2009) Quantitative synthesis of context dependency in ant-plant protection mutualisms. *Ecology* **90**:2384–2392. <https://doi.org/10.1890/08-1490.1>
- Chow P.S., Landhäuser S.M. (2004) A method for routine measurements of total sugar and starch content in woody plant tissues. *Tree Physiology* **24**:1129–1136.
<https://doi.org/10.1093/treephys/24.10.1129>
- Coley P.D., Bryant J.P., Chapin F.S. (1985) Resource availability and plant antiherbivore defense. *Science* **230**:895–899. <https://doi.org/10.1126/science.230.4728.895>
- Demmig-Adams B., Adams W.W. (1996) Xanthophyll cycle and light stress in nature: Uniform response to excess direct sunlight among higher plant species. *Planta* **198**:460–470.
<https://doi.org/10.1007/BF00620064>
- Despland E. (2019) Caterpillars cooperate to overcome plant glandular trichome defenses. *Frontiers in Ecology and Evolution* **7**:1–9. <https://doi.org/10.3389/fevo.2019.00232>
- Dubois M., Gilles K., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. (1956) A colorimetric method for

- determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* **28**:350–356.
<https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Endara M.J., Coley P.D. (2011) The resource availability hypothesis revisited: a meta-analysis. *Functional Ecology* **25**:389–398. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2010.01803.x>
- Folgarait P.J., Davidson D.W. (1994) Antiherbivore defenses of myrmecophytic *Cecropia* under different light regimes. *Oikos* **71**:305–320. <https://doi.org/10.2307/3546279>
- Franks S.J., Weber J.J., Aitken S.N. (2014) Evolutionary and plastic responses to climate change in terrestrial plant populations. *Evolutionary Applications* **7**:123–139.
<https://doi.org/10.1111/eva.12112>
- Grammatikopoulos G., Karabourniotis G., Kyparissis A., Petropoulou Y., Manetas Y. (1994) Leaf hairs of olive (*Olea europaea*) prevent stomatal closure by ultraviolet-B radiation. *Australian Journal of Plant Physiology* **21**:293–301. <https://doi.org/10.1071/PP9940293>
- Gratani L., Covone F., Larcher W. (2006) Leaf plasticity in response to light of three evergreen species of the Mediterranean maquis. *Trees - Structure and Function* **20**:549–558.
<https://doi.org/10.1007/s00468-006-0070-6>
- Groom P.K., Lamont B.B. (1999) Which common indices of sclerophyll best reflect differences in leaf structure? *Ecoscience* **6**:471–474. <https://doi.org/10.1080/11956860.1999.11682537>
- Heil M., McKey D. (2003) Protective ant-plant interactions as model systems in ecological and evolutionary research. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **34**:425–553.
<https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132410>
- Heschel M.S., Sultan S.E., Glover S., Sloan D. (2004) Population differentiation and plastic responses to drought stress in the generalist annual *Polygonum persicaria*. *International Journal of Plant Sciences* **165**:817–824. <https://doi.org/10.1086/421477>
- Hoeksema J.D., Bruna E.M. (2015) Context-dependent outcomes of mutualistic interactions. In: Bronstein JL (ed) *Mutualism*. Oxford University Press, Oxford, pp 181–202.
<https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780199675654.003.0010>
- Hothorn T., Bretz F., Westfall P. (2008) Simultaneous Inference in General Parametric Models. *Biometrical Journal* **50**:346–363. <https://doi.org/10.1002/bimj.200810425>
- Jones I.M., Koptur S., Gallegos H.R., Tardanico J.P., Trainer P.A., Peña J. (2017) Changing light

- conditions in pine rockland habitats affect the intensity and outcome of ant–plant interactions. *Biotropica* **49**:83–91. <https://doi.org/10.1111/btp.12363>
- Karabourniotis G., Bornman J.F. (1999) Penetration of UV-A, UV-B and blue light through the leaf trichome layers of two xeromorphic plants, olive and oak, measured by optical fibre microprobes. *Physiologia Plantarum* **105**:655–661. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1999.105409.x>
- Karabourniotis G., Liakopoulos G., Nikolopoulos D., Bresta P. (2020) Protective and defensive roles of non-glandular trichomes against multiple stresses: structure–function coordination. *Journal of Forestry Research* **31**:1–12. <https://doi.org/10.1007/s11676-019-01034-4>
- Kersch M.F., Fonseca C.R. (2005) Abiotic factors and the conditional outcome of an ant–plant mutualism. *Ecology* **86**:2117–2126. <https://doi.org/10.1890/04-1916>
- Kortekamp A., Wind R., Zyprian E. (1999) The role of hairs on the wettability of grapevine (*Vitis* spp.) leaves. *Vitis* **38**:101–105.
- Lambers H., Chapin F.S., Pons T.L. (2008) *Plant Physiological Ecology*. Springer New York, New York, NY. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-78341-3>
- Lázaro-Nogal A., Matesanz S., Godoy A., Pérez-Trautman F., Gianoli E., Valladares F. (2015) Environmental heterogeneity leads to higher plasticity in dry-edge populations of a semi-arid Chilean shrub: insights into climate change responses. *Journal of Ecology* **103**:338–350. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12372>
- Lichtenthaler H.K., Wellburn A.R. (1983) Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions* **11**:591–592. <https://doi.org/10.1042/bst0110591>
- Lill J.T., Marquis R.J., Forkner R.E., Le corff J., Holmberg N., Barber N.A. (2009) Leaf pubescence affects distribution and abundance of generalist slug caterpillars (Lepidoptera: Limacodidae). *Environmental Entomology* **35**:797–806. <https://doi.org/10.1603/0046-225X-35.3.797>
- Michelangeli F.A. (2003) Ant protection against herbivory in three species of *Tococa* (Melastomataceae) occupying different environments. *Biotropica* **35**:181–188. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7429.2003.tb00277.x>
- Michelangeli F.A. (2005) *Tococa (Melastomataceae)*. Flora Neotropica Monograph 98, New York.

- Moraes S.C., Vasconcelos H.L. (2009) Long-term persistence of a Neotropical ant-plant population in the absence of obligate plant-ants. *Ecology* **90**:2375–2383. <https://doi.org/10.1890/08-1274.1>
- Niinemets Ü., Kull O., Tenhunen J.D. (1998) An analysis of light effects on foliar morphology, physiology, and light interception in temperate deciduous woody species of contrasting shade tolerance. *Tree Physiology* **18**:681–696. <https://doi.org/10.1093/treephys/18.10.681>
- Peeters P.J., Sanson G., Read J. (2007) Leaf biomechanical properties and the densities of herbivorous insect guilds. *Functional Ecology* **21**:246–255. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2006.01223.x>
- Pérez-Harguindeguy N., Díaz S., Vendramini F., Cornelissen J.H.C., Gurvich D.E., Cabido M. (2003) Leaf traits and herbivore selection in the field and in cafeteria experiments. *Austral Ecology* **28**:642–650. <https://doi.org/10.1046/j.1442-9993.2003.01321.x>
- Peter A.J., Shanower T.G., Romeis J. (1995) The role of plant trichomes in insect resistance: a selective review. *Phytophaga* **7**:41–63.
- Poorter H., Niinemets Ü., Ntagkas N., Siebenkäs A., Mäenpää M., Matsubara S., Pons T. (2019) A meta-analysis of plant responses to light intensity for 70 traits ranging from molecules to whole plant performance. *New Phytologist* **223**:1073–1105. <https://doi.org/10.1111/nph.15754>
- Poorter H., Niinemets Ü., Poorter L., Wright I.J., Villar R. (2009) Causes and consequences of variation in leaf mass per area (LMA): A meta-analysis. *New Phytologist* **182**:565–588. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02830.x>
- Poorter L., Rozendaal D.M.A. (2008) Leaf size and leaf display of thirty-eight tropical tree species. *Oecologia* **158**:35–46. <https://doi.org/10.1007/s00442-008-1131-x>
- R Core Team (2017) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria [online]. <https://www.R-project.org/>
- Rozendaal D.M.A., Hurtado V.H., Poorter L. (2006) Plasticity in leaf traits of 38 tropical tree species in response to light; relationships with light demand and adult stature. *Functional Ecology* **20**:207–216. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2006.01105.x>
- Sánchez-Gómez D., Valladares F., Zavala M.A. (2006) Functional traits and plasticity in response to light in seedlings of four Iberian forest tree species. *Tree Physiology* **26**:1425–1433. <https://doi.org/10.1093/treephys/26.11.1425>

- Souza M.L., Duarte A.A., Lovato M.B., Fagundes M., Valladares F., Lemos-Filho J.P. (2018) Climatic factors shaping intraspecific leaf trait variation of a neotropical tree along a rainfall gradient. PLoS ONE **13**. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208512>
- Tang Y. (1997) Light. In: Prasad MN V. (ed) Plant Ecophysiology. John Wiley & Sons, New York, pp 3–40.
- Trager M.D., Bruna E.M. (2006) Effects of plant age, experimental nutrient addition and ant occupancy on herbivory in a neotropical myrmecophyte. Journal of Ecology **94**:1156–1163. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2006.01165.x>
- Turner N.C. (1970) Response of adaxial and abaxial stomata to light. New Phytologist **69**:647–653. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1970.tb02452.x>
- Valladares F., Niinemets Ü. (2008) Shade tolerance, a key plant feature of complex nature and consequences. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics **39**:237–257. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.39.110707.173506>
- Valladares F., Sanchez-Gomez D., Zavala M.A. (2006) Quantitative estimation of phenotypic plasticity: bridging the gap between the evolutionary concept and its ecological applications. Journal of Ecology **94**:1103–1116. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2006.01176.x>
- Vermeij G.J. (2015) Plants that lead: Do some surface features direct enemy traffic on leaves and stems? Biological Journal of the Linnean Society **116**:288–294. <https://doi.org/10.1111/bij.12592>
- Villar R., Ruiz-Robledo J., Ubera J.L., Poorter H. (2013) Exploring variation in leaf mass per area (LMA) from leaf to cell: An anatomical analysis of 26 woody species. American Journal of Botany **100**:1969–1980. <https://doi.org/10.3732/ajb.1200562>
- Warton D.I., Hui F.K.C. (2011) The arcsine is asinine: the analysis of proportions in ecology. Ecology **92**:3–10. <https://doi.org/10.1890/10-0340.1>
- Weischedé J., Martíková J., De Kroon H., Huber H. (2006) Shade avoidance in *Trifolium repens*: costs and benefits of plasticity in petiole length and leaf size. New Phytologist **172**:655–666. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01885.x>
- Weiner J., Campbell L.G., Pino J., Echarte L. (2009) The allometry of reproduction within plant populations. Journal of Ecology **97**:1220–1233. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2009.01559.x>

Xiao K., Mao X., Lin Y. (2017) Trichome, a functional diversity phenotype in plant. Molecular Biology **6**:1–6. <https://doi.org/10.4172/2168-9547.1000183>

Yamawo A., Hada Y. (2010) Effects of light on direct and indirect defences against herbivores of young plants of *Mallotus japonicus* demonstrate a trade-off between two indirect defence traits. Annals of Botany **106**:143–148. <https://doi.org/10.1093/aob/mcq093>

Considerações finais

Formigas associadas à mirmecófita *Miconia tococa* afetam positivamente o crescimento e a reprodução da planta hospedeira, por meio da redução da herbivoria foliar e da herbivoria floral. Experimentalmente, foi possível verificar que a redução da herbivoria é o benefício na interação mutualista que mais afeta o crescimento da planta hospedeira, e pode, consequentemente, afetar a reprodução dos indivíduos, já que o potencial reprodutivo depende do tamanho das plantas. O fornecimento de nutrientes pelas formigas parece não ser um fator determinante para as plantas no ambiente estudado.

Apesar das plantas protegidas contra herbivoria terem se desenvolvido mais, plantas sem essa proteção sobreviveram ao longo do experimento mesmo crescendo mais lentamente, o que pode ser um indício que a espécie apresenta algum grau de tolerância à herbivoria, e que essa tolerância pode contribuir com a manutenção de populações no limite sul da distribuição de *M. tococa* sem parceiros mutualistas obrigatórios.

Além da tolerância à herbivoria, as condições abióticas também podem colaborar para a manutenção dessas populações sem as formigas obrigatórias. Plantas crescendo em ambientes mais ensolarados, como a borda da mata de galeria, se mostraram mais produtivas, produzindo um maior número de inflorescências, do que as plantas do interior da mata. Dessa forma, o aumento de energia luminosa pode compensar, em parte, a falta do parceiro mutualista e garantir a manutenção dessas populações.

Avaliando ainda a reprodução dessas mesmas populações, verificou-se que os botões florais produzem néctar extranupcial para atrair formigas. Como as plantas não são colonizadas por formigas obrigatórias, formigas oportunistas são atraídas e forrageiam nas inflorescências, protegendo as estruturas florais contra herbívoros. Então, apesar de estudos anteriores terem demonstrado que as formigas oportunistas não são eficientes para proteger *M. tococa* de herbívoros

foliares, essas formigas podem ter um papel fundamental em garantir o sucesso reprodutivo dessa mirmecófita nesses locais.

Como continuidade desse trabalho, seria importante entender como os fatores abióticos afetam outras populações de *M. tococa*, visto que essa espécie apresenta uma ampla distribuição geográfica e habita uma grande variedade de ambientes. Ainda, estudos em outras populações, colonizadas por outras espécies de formigas obrigatórias, esclareceria a contribuição dos nectários extranupciais para o sucesso reprodutivo da planta hospedeira e o comportamento dessas formigas na proteção das inflorescências, considerando que entre os parceiros mutualistas pode haver um conflito de interesses.