

Universidade Federal de Uberlândia
Pós-Graduação em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais
Instituto de Biologia

**ECOLOGIA DA INTERAÇÃO ENTRE FORMIGAS, HERBÍVOROS E *OURATEA*
SPECTABILIS ENGL. (OCHNACEAE): CONDICIONALIDADE NOS RESULTADOS
DAS ASSOCIAÇÕES DEPENDENTE DE VARIAÇÃO GEOGRÁFICA E TEMPORAL -
UMA DISCUSSÃO À LUZ DA TEORIA DOS MOSAICOS GEOGRÁFICOS DA
COEVOLUÇÃO DE THOMPSON**

Jonas Byk

2010

Jonas Byk

**ECOLOGIA DA INTERAÇÃO ENTRE FORMIGAS, HERBÍVOROS E *OURATEA SPECTABILIS*
ENGL. (OCHNACEAE): CONDICIONALIDADE NOS RESULTADOS DAS ASSOCIAÇÕES
DEPENDENTE DE VARIAÇÃO GEOGRÁFICA E TEMPORAL - UMA DISCUSSÃO À LUZ DA
TEORIA DOS MOSAICOS GEOGRÁFICOS DA COEVOLUÇÃO DE THOMPSON**

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

Orientador: Prof. Dr. Kleber Del Claro

Uberlândia
Fevereiro de 2010

Jonas Byk

**ECOLOGIA DA INTERAÇÃO ENTRE FORMIGAS, HERBÍVOROS E *OURATEA SPECTABILIS*
ENGL. (OCHNACEAE): CONDICIONALIDADE NOS RESULTADOS DAS ASSOCIAÇÕES
DEPENDENTE DE VARIAÇÃO GEOGRÁFICA E TEMPORAL - UMA DISCUSSÃO À LUZ DA
TEORIA DOS MOSAICOS GEOGRÁFICOS DA COEVOLUÇÃO DE THOMPSON**

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

Aprovada em 25 de Fevereiro de 2010

Profa. Dra. Juliane Floriano Lopes Santos UFJF

Prof.Dr. Sérvio Pontes Ribeiro UFOP

Profa. Dra. Helena Maura Torezan Silingardi UFU

Prof. Dr. Marcelo Oliveira Gonzaga UFU

Prof. Dr. Kleber Del Claro- UFU
(Orientador)

Suplentes

Profa. Dra. Fernanda Helena Nogueira Ferreira UFU

Prof. Dr. Jean Carlos Santos UFU

Uberlândia
Fevereiro de 2010

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Kleber Del Claro, pela paciência e ensinamentos, tanto como profissional como pessoal;

A Vanessa Lima (minha companheira), pela compreensão, paciência e dedicação;

Aos que me ajudaram em momentos de incertezas: médicos da Santa Casa-BH e Hospital de Clínicas – BH e vários amigos (À Casa São Francisco de Assis, Rivane Simão, Vanessa Lima, aos Professores Solange Augusto, Paulo e Renata Oliveira, ao meu orientador e sua família);

Aos amigos Eduardo Siqueira, Cristiano Schetini, Vanessa Stefani Sul Moreira, Iara Novelli, Nathielle Schumacher e Elisiane Dall'Oglio, muitos que apesar da distância sempre estiverem presentes;

A Aramis Martins de Pinho, pelo empréstimo do cavalo, Rogaciano Silva (Bicicletaria Água Clara), por cuidar e zelar da minha bicicleta durante o período de coleta; Camila Aoki, Profa. Dra. Alexandra Penedo (UFMS), Prof. Dr. Arnildo Pott (EMBRAPA) pela ajuda em encontrar a área de campo e empréstimo de materiais. Todos colaboraram muito para que as coletas no Mato Grosso do Sul fossem realizadas;

Agradeço aos colegas Estevão Alves da Silva e Everton Pedroso, por molharem as plantas em laboratório enquanto viajava. Maura Silingardi, pelo auxílio na botânica e materiais de campo emprestado (em especial a escada), além da grande amizade, sua preocupação comparável a uma mãe e companheirismo na reserva; A Bia Baker, Scott Powel e Ennes Dantas, grandes companheiros de final de semana e visitas noturnas à reserva, e Vanessa Stefani, pelas coletas abaixo de chuva;

Em Brasília tive apoio de muitos, dos quais gostaria de mencionar os Professores Dr. Paulo Mota, Dra. Regina Macedo e Dra. Helena Castanheira (UNB), Rivane e Romeni Simão, Rafael Miranda, pelas caronas até a Fazenda Água Limpa. A direção do IBGE, FAL-UNB, Aeroporto e Jardim Botânico de Brasília, pela autorização das coletas;

Ao Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), Grupo Gerdau e Estação climatológica da UFU, pelos dados climatológicos fornecidos;

A Sociedade Para a Conservação da Selva Paranaense – SELVA PARANAENSE (Cascavel – PR), em especial ao diretor geral, Luiz Eduardo Silveira Delgado;

A Universidade Federal de Juiz de Fora, da qual usei muitos materiais que restaram do mestrado em especial as resinas e passagens; Aos professores do Mestrado em Comportamento e Biologia Animal, pelo incentivo e companheirismo;

Pelas várias bolsas emprestadas que tive, não posso deixar de agradecer à Coordenação do Curso de Pós-Graduação de Química, História, Engenharia Química e Engenharia Mecânica (UFU), bem como pelo empenho do Pró-reitor de Pesquisa da época, Professor Eduardo, ao Diretor de Pós-Graduação e do Coordenador da PG-ECRN da época, Professor Dr. Kleber Del Claro;

Aos professores Dr.Erik Daemom e Dra. Marta D'Agosto (UFJF) pelos e conselhos;

Aos funcionários do INBIO, em especial a Helena, Nívea e Maria Angélica;

Aos demais companheiros do L.E.C.I. : Ana Paula Korndorfer, Guilherme Yague, Graziela Diógenes, Ceres Belchior, Alexandra (Cuca), Andréa Andrade, Everton, Natalia, Denise Lange, Fernanda Martins, e tantos outros que já passaram por aqui;

Renata Pacheco, pelo auxílio na identificação em algumas espécies de formigas;

Aos demais amigos, colegas e funcionários que ficam em meio às mudanças, muitas vezes esquecidos;

Ao Dr. Antonio Fernandes Nascimento Junior e a Dra. Maria do Socorro Baungartner, os quais abriram as primeiras portas durante a graduação;

Aos familiares;

A FAPEMIG.

ÍNDICE GERAL

LISTA DE FIGURAS
LISTA DE TABELAS
RESUMO GERAL
GENERAL ABSTRACT

1- INTRODUCAO GERAL	1
1.1 Coevolução	1
1.2 A Teoria dos Mosaicos Geográficos da Coevolução	2
1.3 Interação formiga-planta como modelo de estudos de herbivoria	7
1.4 Os Trópicos	7
1.5 O Cerrado	8
1.6 Os modelos de coevolução	9
2. OBJETIVO GERAL	13
3 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15

CAPITULO 1 – Direct effects of extra floral nectar on the fitness of ants: evidence from a long-term study

Resumo	24
1 – INTRODUCTION	26
2 – MATERIAL AND METHODS	27
3 – RESULTS	30
4 – DISCUSSION	33
5 – REFERENCES	36

CAPITULO 2 – Nectar- and pollen-gathering *Cephalotes* ants provide no protection against herbivory: a new manipulative experiment to test ant protective capabilities

Resumo	41
1 – INTRODUCTION	43
2 – MATERIAL AND E METHODS	44
3 – RESULTS	46

4 – DISCUSSION	49
5 – LITERATURE CITED	52

CAPITULO 3 – ECOLOGIA DA INTERAÇÃO ENTRE FORMIGAS, HERBÍVOROS E *OURATEA SPECTABILIS* ENGL. (OCHNACEAE): UM TESTE SOBRE A TEORIA DO MOSAICO GEOGRÁFICO DE THOMPSON

RESUMO	55
1 – INTRODUÇÃO	57
2 – MATERIAL E MÉTODOS	60
2.1 – Área de estudo	60
2.2 - Mensuração da herbivoria foliar	61
2.3 - Herbivoria floral (ou Impacto Reprodutivo)	62
2.4 - Identificação de formigas associadas	63
2.5 - Identificação de insetos herbívoros	63
3 – RESULTADOS	65
4 – DISCUSSÃO	75
5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
 CONSIDERAÇÕES GERAIS	 85

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO I

Figure 1. Number of individuals (mean $\pm$ 1SD) in colonies of the ant *Cephalotes pusillus* Klug, 1824 (Myrmicinae) that had access to plants of *Chamaecrista desvauxii* (Caesalpiniaceae) with active EFNs (N=11 control colonies) or plants with damaged and non productive EFNs (N=11 treatment colonies) during one year. *** means statistical difference between groups ($p < 0.0001$, $t = 8,1164$, $df = 20$). 29

Figure 2. Number of eggs (mean $\pm$ 1SD) in colonies of the ant *Cephalotes pusillus* Klug, 1824 (Myrmicinae) that had access to plants of *Chamaecrista desvauxii* (Caesalpiniaceae) with active EFNs (N=11 control colonies) or plants with damaged and non productive EFNs (N=11 treatment colonies) after one year. *** means statistical difference between groups ($p < 0.0001$, $t = 8,4896$, $df = 20$). 30

Figure 3. Comparative weight (mean $\pm$ 1 EP; a- queens; b- workers; c- soldiers; d- eggs) of *Cephalotes pusillus* ants bred with access to *Chamaecrista desvauxii* plants with active (control group, N=11) and damaged and non active extrafloral nectaries (treatment group, N=11). *** means statistical difference ($p < 0,0001$; Mann Whitney U-test). 31

CAPÍTULO 2

Figure 1. A worker of *Camponotus crassus* Mayr feeding on an extrafloral nectar of the tree *Orotea specatibilis* Engl. (Ochnaceae) in the Brazilian tropical savannah (Cerrado). 45

Figure 2. Manipulative experimental tests on stems (control – stems with free ant access; *Cephalotes* treatment – stems only with *Cephalotes pusillus* ants; ant-free treatment – stems without ants) of the extrafloral nectar bearing plant *Orotea spectabilis* (Ochnaceae; N = 11 trees) in the Cerrado vegetation. Data are means of: leaf herbivory, fruits per bud or seeds produced per fruits, of 11 stems of each treatment $\pm$ SE. Results showed no differences in foliar herbivory and floral bud production between groups. Control stems produced significant more fruits and seeds than the other ones. Analysis through Friedman ANOVA test. 46

CAPÍTULO 3

FIGURA 1 - Localização geográfica dos pontos de coletas: Brasília – Distrito Federal; Uberlândia – Minas Gerais e Água Clara- Mato Grosso do Sul. 59

FIGURA 2 A e B. Vista geral da área de estudo em Uberlândia - MG; C) indivíduo experimental de *Ouratea spectabilis*, D) vista parcial da área de estudo em Água Clara - MS; E e F) Vista da área de estudo em Brasília – DF 61

FIGURA 3. Câmara para desenvolvimento de larvas de insetos herbívoros. A) Os três compartimentos apresentados separadamente e em seqüência; B) A câmara já montada. As setas ao centro indicam o direcionamento do vôo de indivíduos recém eclodidos..... 63

FIGURA 4. Dados climatológicos (temperatura e pluviosidade) nas três áreas de coleta entre outubro de 2006 à fevereiro de 2008 (médias mensais). Barras indicam temperatura (° C) e colunas a pluviosidade (mm). Fonte: Estação climatológica da UFU para dados de Uberlândia – MG; Grupo Guerdau para dados de Água Clara – MS e INMET para dados de Brasília – DF 65

FIGURA 5. A) envoltórios de Lepidoptera encontrados em *Ouratea spectabilis*; B) envoltório ocupado por *Crematogaster* sp.; C) *Crematogaster* sp. alimentando-se de NEF em ramo experimental na região de Água Clara - MS..... 66

FIGURA 6. A) ninho de *Cephalotes pusilus* no súber de *Ouratea spectabilis* em Uberlândia - MG; B) espessura do súber em plantas de Água Clara - MS; C) espessura de súber em plantas experimentais de Brasília – DF 67

FIGURA 7. Comparação entre a porcentagem média de herbivoria em ramos de *Ouratea spectabilis* (Ochnaceae) na presença (linhas contínuas) e na ausência (linhas tracejadas) de formigas visitantes nas áreas de Uberlândia, Água Clara e Brasília entre outubro de 2006 à fevereiro de 2008. O símbolo “***” indica que as médias diferiram significativamente entre os grupos ($p < 0,001$; ANOVA para medidas repetidas) 71

FIGURA 8 – Comparação entre a taxa média de frutos formados por botões produzidos de *Ouratea spectabilis* (Ochnaceae) na presença (barras enegrecidas) e na ausência (barras vazias) de formigas visitantes dos nectários extraflorais. Para áreas: A) Uberlândia – MG; B) Água Clara – MS e C) Brasília - DF. (***) indicam diferença significativa entre os dados (Teste U de Mann-Whitney, $p < 0,001$). 72

FIGURA 9 – Comparação entre o número médio de sementes produzidos de *Ouratea spectabilis* (Ochnaceae) na presença (barras enegrecidas) e na ausência (barras vazias) de formigas visitantes. Para áreas: A) Uberlândia – MG; B) Água Clara – MS e C) Brasília - DF (***) indicam diferença significativa entre grupos (Teste U de Mann-Whitney, $p < 0,001$). 73

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

TABLE 1. Ant species observed visiting extrafloral nectar glands on control stems of <i>Ouratea spectabilis</i> (Ochnaceae) in a cerrado reserve in Uberlândia, Brazil. (D = diurnal species; N = nocturnal species).	47
--	----

CAPÍTULO 3

TABELA 1 - Espécies de formigas encontradas em indivíduos experimentais de <i>Ouratea spectabilis</i> (Ochnaceae) entre outubro de 2006 à fevereiro de 2008. Para áreas: I) Uberlândia – MG; II) Água Clara – MS e III) Brasília – DF	68
---	----

TABELA 2 – Morfoespécies de herbívoros encontrados em indivíduos experimentais de <i>Ouratea spectabilis</i> (Ochnaceae) entre outubro de 2006 à fevereiro de 2008. Para áreas: I) Uberlândia – MG; II) Água Clara – MS e III) Brasília - DF	70
---	----

RESUMO GERAL

ECOLOGIA DA INTERAÇÃO ENTRE FORMIGAS, HERBÍVOROS E *OURATEA SPECTABILIS* ENGL. (OCHNACEAE). CONDICIONALIDADE NOS RESULTADOS DAS ASSOCIAÇÕES DEPENDENTE DE VARIAÇÃO GEOGRÁFICA E TEMPORAL- UMA DISCUSSÃO À LUZ DA TEORIA DOS MOSAICOS GEOGRÁFICOS DA COEVOLUÇÃO DE THOMPSON

A herbivoria é um importante fator de estruturação e diversidade das comunidades naturais, e varia em função de sazonalidade, variação espacial e pelas interações planta-herbívoros-predadores. Como resposta à herbivoria, as plantas apresentam diferentes estratégias de defesa, principalmente químicas, físicas, fenológicas ou bióticas. As associações com formigas, atraídas por nectários extraflorais (NEFs), são provavelmente as principais defesas bióticas dos vegetais. A presente tese como objetivo avaliar a variação ao longo do tempo dos benefícios conferidos pelas formigas visitantes de NEFs de *Ouratea spectabilis* (Ochnaceae) no ambiente Cerrado, contra a ação de herbívoros. A hipótese que todas as espécies de formigas protegem a planta ao receber néctar extrafloral. Para tal, avaliou-se o quanto as formigas ganham ao visitar nectários extraflorais. Montamos três experimentos, isoladamente: no primeiro, manipulamos em laboratório, formigueiros e plantas com e sem NEFs para mensuramos o ganho das formigas em receber o néctar extrafloral foi testada como alimento complementar; no segundo avaliamos em campo o desempenho de uma espécie de formiga (*Cephalotes pusilus*) para saber se todas as espécies realmente conferem proteção as plantas portadoras de NEFs e em um ultimo experimento, através da permanência e exclusão de formigas, avaliamos a interação simultaneamente por dois anos em Uberlândia – MG, Água Clara – MS e Brasília – DF, afim de testar a Teoria dos Mosaicos Geográficos da Coevolução. Conseguimos demonstrar pela primeira vez, de forma evidente, que formigas obtém benefícios ao se alimentar de néctar extrafloral, aumentando o peso e número de indivíduos no decorrer de um ano. Conseguimos demonstrar que algumas formigas, neste caso *Cephalotes pusilus*, não confere proteção alguma a planta e que simplesmente se alimenta de néctar e pólen, mostrando que nem todas as espécies se comportam de maneira agressiva e possuem características para proteger a planta. E no ultimo caso, conseguimos demonstrar que as interações entre formigas e *Ouratea spectabilis* apresentam o mesmo significado ecológico, independendo da região geográfica. Sugere-se que se um tipo de interação é resultado de coevolução, o conjunto de elementos interagentes está sujeito a pressões seletivas semelhantes que conduzirão a interação para um mesmo resultado, neste caso, uma relação mutualística, corroborando com a teoria que foi testada.

Palavras-chave: mutualismo, mosaicos geográficos, coevolução, interação inseto-planta, formigas, comportamento

GENERAL ABSTRACT

ECOLOGY OF THE INTERACTION BETWEEN ANTS, HERBIVORES AND *Ouratea spectabilis* ENGL. (Ochnaceae). CONDICIONALITY IN THE RESULTS OF TEMPORAL AND GEOGRAPHICAL DEPENDENT VARIATION - A DISCUSSION UNDER THE LIGHT OF THE THEORY OF GEOGRAPHIC MOSAICS OF COEVOLUTION BY THOMPSON

The herbivory is an important factor for the structuring and diversity of natural communities, and may be influenced by factors such as seasonality, and spatial interactions by plant-herbivores-predators. In response to herbivory plants have different defense strategies, mainly chemical, physical, phenological or biotic. The associations with ants, attracted by extrafloral nectaries (EFN), are probably the main biotic defenses of plants. This thesis aims to determine the variation over time, the benefits conferred by the ant EFN visitors from *Ouratea spectabilis* (Ochnaceae) in the Cerrado environment, against the action of herbivores if all species of ants actually protect the plant to receive extrafloral nectar and how the ants win by visiting extrafloral nectaries. We set up three experiments in isolation: one in which we manipulated in the laboratory, ants and plants with and without EFNS to measure the gain that the ants get in the extrafloral nectar as a food supplement. In the second chapter, we evaluated the performance of a species of ant (*Cephalotes pusilus*) to see if all the species actually confer protection to plants with EFN and a final experiment, by the time spent and the exclusion of ants, we evaluated the interaction simultaneously for two years in Uberlândia - MG, Água Clara - MS and Brasília - DF, in order to test the geographical mosaic theory of coevolution. We demonstrated for the first time, in an obvious way, that ants benefit by feeding on extrafloral nectar, increasing the weight and number of individuals in the course of a year. We showed that some ants, in this case *Cephalotes pusilus* do not confer protection to the plant and that just feed on nectar and pollen, showing that not all species behave aggressively and have features to protect the plant. In the final experiment, we could demonstrate that the interactions between ants and *Ouratea spectabilis* have the same ecological significance regardless of geographic region. It is suggested that one type of interaction is the result of coevolution, the set of interacting elements are subject to similar selective pressures that lead to interaction for the same outcome in this case, a mutualistic interaction, which corroborates the theory that was tested

Keywords: mutualism, geographic mosaic, coevolution, interaction insect-plant, ants, behavior.

1- INTRODUÇÃO GERAL

Aproximadamente, há duzentos milhões de anos, formava-se um supercontinente contínuo denominado Pangea. Após o Jurássico Médio, o Pangea dividiu-se em dois blocos (norte e sul). Ao norte, estava conectado a Austrália, África, América do Sul e Índia com conexão a Antártica. Esta divisão promoveu caminhos evolutivos separados na biota do mundo. No Cenozóico, as ligações entre Antártica e Austrália foram rompidas, guardando uma amostra a parte desta última, devido a não ter glaciado. O restante das áreas continuou sofrendo mudanças mais bruscas (HOPPER *et al.* 1996). Muitas dessas regiões foram se moldando com características desérticas, incluindo a Austrália, com pluviosidade concentrada durante os verões, levando também a formações botânicas semelhantes, incluindo regiões suscetíveis a queimadas, devido à ausência de chuvas em determinadas épocas do ano, a qual talvez tenha desempenhado um papel na evolução da biota (GILL, 1975). Milhares de anos se passaram até o alinhamento destas áreas entre os trópicos, proporcionando condições semelhantes, mas em continentes separados. Diversas famílias de plantas alcançaram um pico de riqueza na América do Sul, África e Austrália e desde os primórdios, provavelmente estabelecendo alguma relação com a fauna presente (LAMONT, 2005). Hoje temos, nestes locais, os *hotspots* da biodiversidade mundial (MYERS, *et al.*, 2000).

1.1- Coevolução

As plantas sob efeito de pressões seletivas adaptaram-se aos efeitos nocivos da herbivoria, enquanto os animais herbívoros se adaptaram aos seus suprimentos alimentares. Bons exemplos são os insetos herbívoros e espécies lenhosas dos trópicos (JANZEN, 1975; MAIORANA, 1978). Não só insetos herbívoros procuram plantas como parcela de seu habitat ou nicho. Outros insetos procuram plantas em busca de outros recursos como néctar floral e extrafloral e/ou para predação herbívoros, como fazem membros de algumas famílias de Hymenoptera, principalmente os Formicidae.

A associação entre insetos e plantas tem-se destacado dentre os estudos de História Natural, com grande destaque para formigas. Esses estudos sugerem que formigas e plantas podem afetar um ao outro em suas vidas de diversas maneiras e níveis de complexidade (JANZEN, 1966; MARQUIS & BRAKER, 1994; OLIVEIRA & PIE, 1998; ABDALA-ROBERTS & PARRA-TABLA, 2005).

A evidência fóssil para interações “formiga-planta” é muito fragmentada, datando do Oligoceno (PEMBERTON, 1992). Essas associações são muito importantes,

principalmente pela gama de animais e variedade de táxons envolvidos: aranhas, insetos (e.g. vespas, abelhas, moscas, besouros, hemípteros, formigas) e vertebrados; sugerindo a existência de um efeito relativo desse grupo. (CUAUTLE & RICO-GRAY, 2003; HEIL & MCKEY, 2003). Há muitos casos descritos onde estes animais protegem as plantas BOUCHER *et al.*, 1982, KEELER, 1989). Em contrapartida, estas podem receber alimento (corpúsculos protéicos ou exudatos) (BENTLEY, 1977; DEL-CLARO *et al.* 1996), local para nidificação (BEQUAERT, 1922); ou ambos (JANZEN, 1966).

Sistemas “formigas-plantas-outros artrópodes” têm sido apontados como modelos para uma melhor compreensão da “biodiversidade interativa” (THOMPSON, 1997; 2005). A diversidade de relações bióticas em uma dada localidade parece ser a ferramenta fundamental para o desenvolvimento de estratégias para a manutenção da viabilidade das comunidades naturais (THOMPSON, 2005; OLIVEIRA & DEL-CLARO, 2005). Ao que parece, relações mutualísticas são exemplos de coevolução entre espécies ou grupos de espécies, havendo grande conservacionismo filogeográfico e filogenético nessas associações (THOMPSON, 2005).

1.2- A Teoria dos Mosaicos Geográficos da Coevolução

Ainda é possível ler afirmações que defendem que uma interação não é ou está, verdadeiramente, coevoluída porque ela “se rompe” em algumas populações ou parece não ocorrer em outras. Por esta definição tipológica, não-biológica, uma interação é coevoluída somente se apresentar clara reciprocidade em todas as populações (THOMPSON, 2005). Esta visão antiga se tornou crescentemente insustentável à medida que aprendemos mais sobre a estrutura genética e ecológica de espécies reais e a estrutura hierárquica da dinâmica coevolucionária. A coevolução é um processo crucial na organização da biodiversidade, especificamente porque ela é simultaneamente flexível, ainda que conservativa, e molda interações interespecíficas num mundo em constantes mudanças.

As observações empíricas sugerem que a coevolução é um processo dinâmico e inerentemente geográfico (THOMPSON, 2005). A teoria do mosaico da coevolução foi desenvolvida como uma tentativa de organizar o que aprendemos sobre a estrutura ecológica, genética e filogenética de espécies reais em um arcabouço hierárquico para análise coevolucionária (THOMPSON 1994, 1997, 1999, 1999b, 2001; THOMPSON & CUNNINGHAM 2002, THOMPSON 2005). Basicamente, a Teoria dos Mosaicos Geográficos da Coevolução, proposta por THOMPSON (2005), apresenta cinco hipóteses:

-“As espécies são grupos de populações geneticamente diferenciadas, e a

maioria das espécies que interagem não tem variações geográficas.

-As espécies são filogeneticamente conservativas em suas interações, e este conservacionismo geralmente traz relações interespecíficas por longos períodos de tempo.

-A maioria das populações locais especializa suas interações sobre outras poucas espécies.

-As consequências ecológicas destas interações interespecíficas diferem entre as comunidades.

-As espécies geralmente se tornam localmente adaptadas a populações locais de outras espécies e continuam a evoluir rapidamente”.

Levados como suposições, há sugestões que a evolução contínua tem três atributos não evidentes no nível da seleção coevolucionária local e isolada, segundo THOMPSON, (2005): “1) Mosaicos de seleção geográfica: a seleção natural em interações interespecíficas varia entre populações em parte porque há diferenças geográficas na forma como a adequação em uma espécie, que depende da distribuição de genótipos em outra espécie. Os meios poderiam diferir fisicamente (temperatura), ou em como estas duas espécies interagem com outras espécies. Estas duas continuam a interagir em ambos os meios, mas como qualquer genótipo específico de uma espécie, pode afetar a adequação de qualquer genótipo da outra espécie, podendo diferir entre os meios. 2) *Hotspots* de coevolução: a seleção natural numa interação não é recíproca em todas as comunidades nas quais ocorre. Ao invés disso, regiões nas quais a seleção na interação é realmente recíproca – áreas susceptíveis de coevolução – serão geralmente providas de uma rede mais ampla de habitats e regiões nas quais a interação impõe seleção sobre apenas uma das espécies ou em nenhuma espécie, como por exemplo em áreas pouco susceptíveis a coevolução. Numa interação pareada, uma região pouco susceptível a coevolução é aquela na qual a seleção sobre pelo menos uma das espécies não depende da distribuição de genótipos de outra. Desde que poucas espécies co-ocorram por todas suas variações geográficas inteiras, algumas regiões serão localidades pouco susceptíveis a coevolução para uma interação, simplesmente porque uma das espécies não ocorre lá. Tais regiões pouco susceptíveis são quase inevitáveis, exceto por alguns mutualismos obrigatórios recíprocos. A coevolução, conseqüentemente, não requer que as espécies que interagem tenham variações geográficas completamente coincidentes. Tal visão ignora o mosaico geográfico do processo coevolucionário. 3) Remistura ou Rearranjo de Caracteres: novas mutações ao fluir dos genes, através das paisagens, o fluxo genético aleatório e a extinção de populações locais posteriormente propulsionam

o mosaico geográfico da coevolução, alterando a distribuição espacial de alelos e caracteres potencialmente coevoluidos. Mesmo se uma interação é antagonista através de todas as populações, populações locais podem diferir a qualquer momento no tempo, na variedade de alelos de defesa e contra-defesa sobre os quais a seleção pode atuar (THOMPSON, 2005).

A teoria da coevolução do mosaico geográfico consequentemente argumenta que a coevolução é um processo evolucionário tripartidário, que continuamente remolda as interações de espécies que estão evoluindo através dos espaços geográficos (THOMPSON 1994), o que nos permite testar em campo. Mosaicos de seleção geográficos, regiões susceptíveis de coevolução e remistura de caracteres, juntos, adicionam um nível mais elevado de dinâmicas ao processo coevolucionário do que o que ocorre em nível de populações locais. Através dessa estrutura dinâmica, interações interespecíficas coevoluem há milênios sobre espaços geográficos que estão em constante mudança, dos quais podemos analisar experimentalmente, desde que haja um modelo experimental para testar tais processos.

A maior parte da coevolução é consequentemente tanto um processo ecológico, quanto um processo evolucionário, criando uma mudança dinâmica, contínua e recíproca através dos espaços geográficos sem necessariamente conduzir a uma grande mudança na diversidade das espécies. Este é um processo que conecta as populações e mantém as interações intactas, mesmo se uma população local se extinguir. Populações de uma espécie competidora ganham em ambientes mais mornos ou mais secos, assim como populações de outras espécies ganham em meios mais frios ou mais úmidos. Mutualistas em populações diferentes convergem em combinações diferentes de caracteres e igualmente em combinações diferentes de parceiros. Indivíduos com caracteres coevoluidos diferentes se movem entre populações, se adicionando à dinâmica regional do processo coevolucionário (THOMPSON 2005).

Segundo THOMPSON (2005), esta mistura e combinação de genes, caracteres, efeitos e participantes através dos espaços geográficos se torna a verdadeira estrutura ecológica das interações interespecíficas e da coevolução. O mosaico geográfico em constante mudança se torna tão importante como o papel da coevolução na diversificação das espécies, porque ele conecta diretamente a evolução com a ecologia, espécies com comunidades, e comunidades através de regiões e mesmo continentes. É uma parte central da explicação de como as espécies persistem por tanto tempo em meio a contínuos ataques de múltiplas espécies inimigas e de frequentes mudanças climáticas.

À Luz da sua teoria (GMC - Geographic Mosaic of Coevolution) THOMPSON,

(2005) faz três previsões gerais sobre a estrutura ecológica e a dinâmica de táxons que coevoluem:

Primeira – “*As populações diferem nos caracteres moldados por uma interação: diferenças geográficas em caracteres coevoluídos são uma consequência inevitável dos mosaicos de seleção geográfica, dos hotspots coevolutivos e do rearranjo de caracteres. Estas diferenças populacionais podem ser manifestadas de muitas maneiras. Espécies que coevoluem podem mostrar evidências da adaptação local apenas em algumas populações. Algumas espécies nas interações podem mostrar evidências mais fortes de adaptação recíproca que outras (hotspots coevolucionários). A estrutura geográfica geral de uma interação coevolutiva pode mostrar evidências de continuidade ou mosaicos em caracteres moldados pela coevolução. As fronteiras ou limites geográficos das variações das espécies são, mais provavelmente, zonas altamente dinâmicas para a evolução de novas características nas interações de coevolução, à medida que as espécies alcançam regiões que diferem em condições abióticas ou no contexto da comunidade*”.

Segunda – “*Caracteres de espécies que interagem são bem pareados em apenas algumas comunidades: o fluxo de genes e a dinâmica metapopulacional misturam caracteres localmente coevoluídos com caracteres coevoluídos de outras populações. Consequentemente, caracteres não bem-pareados são prováveis em pelo menos algumas populações. A dinâmica temporal da coevolução pode também apresentar características mal-pareadas transitórias dentro de comunidades locais, pois espécies respondem sequencialmente umas às outras. O fluxo de genes e a dinâmica da metapopulação, porém, adicionam ainda mais dimensões, criando continuidade na adaptação através dos espaços geográficos. Em alguns casos, as populações podem manter caracteres coevoluídos apenas através do fluxo de genes com outras populações*”.

Terceira – “*Poucos caracteres coevoluídos se alastram por todas as populações se tornando caracteres fixos dentro das espécies, porque poucos caracteres coevoluídos são favorecidos entre todas as populações: esta previsão vem a partir das duas primeiras. Caracteres recém coevoluídos podem emergir em qualquer população ao longo do tempo e do alcance de variações de uma interação, mas apenas poucos destes caracteres irão se alastrar além de seu local de origem. A coevolução é um processo tão dinâmico que qualquer análise de diferenças fixadas em caracteres entre espécies está*

fadada a subestimar os caracteres moldados pela coevolução”.

A teoria do mosaico sugere uma visão mundial das dinâmicas coevolucionárias próxima à teoria da estrutura de mudança evolucionária de Wright (ou Teoria do balanço variante de Wright), mais próxima que da teoria dos tamanhos de populações grandes de Fisher (THOMPSON 1994). WADE & GOODNIGHT (1998) argumentaram que Wright enxergou o problema essencial da evolução como sendo o desconhecimento do processo adaptativo num mundo em constante mudança. Em sua visão, os mais importantes processos evolucionários que direcionam as mudanças são uma combinação de seleção natural local envolvendo epistasia e pleiotropia, mudança genética aleatória, fluxo genético, e seleção entre populações (interdêmica). Estes processos ocorrem num contexto ecológico que geralmente inclui populações pequenas, subdivididas e alelos cujos efeitos variam entre os ambientes. Em contraste, o argumento de Fisher enfatizou o refinamento contínuo da adaptação em populações pan-míticas grandes, dentro de ambientes estáveis ou em mudança lenta (THOMPSON, 1994). Dentro desta visão, mutação e seleção são os processos evolucionários dominantes e agem nos efeitos aditivos dos alelos. A teoria do mosaico geográfico da coevolução, porém, difere da visão particular de Wright na ênfase sobre o balanço variável da evolução em aspectos importantes. Wright estava preocupado com o problema de como mudar de um pico adaptativo para outro. No mosaico geográfico da coevolução, o problema é como manter as espécies coevoluindo ao longo de milênios à medida que os picos coevolucionários continuam a mudar ao longo de gradientes geográficos reais que incluem mosaicos de seleção geográfica, *hotspots* e *coldspots* coevolucionários (Thompson, 2005).

Em 1980, Daniel Janzen escreveu um artigo chamado “Quando é coevolução?”, como uma tentativa de interromper a tendência de alguns pesquisadores em supor que todo caractere envolvido em uma interação interespecífica é um resultado direto da coevolução. Desde então, estudos de mutualismo geralmente se concentraram sobre a proporção de custos e benefícios do valor adaptativo resultante de uma interação ou sobre a interpretação de como caracteres particulares contribuem para o mutualismo (THOMPSON 2005, BRONSTEIN 2009).

Obter evidências para a coevolução requer múltiplas abordagens observacionais e experimentais que une subdisciplinas. Num nível prático, uma análise que fornece algumas informações sobre todas estas formas de evidência envolve: 1) usar observações ecológicas para identificar pares ou grupos de espécies que têm o potencial para trazer a tona efeitos sobre o valor adaptativo das características, 2) as fontes

potenciais de seleção diferencial sobre a interação entre comunidades, e 3) as condições possíveis que favorecem a coevolução. THOMPSON (2005) separa essas evidências em: nível local, nível geográfico, níveis de espécies e linhagem filogenética, e por último, redes multiespecíficas e multilinhagens.

1.3- Interação formiga-planta como modelo de estudos de herbivoria

As interações entre formigas e plantas têm sido estudadas intensamente nas últimas três décadas. No início desses estudos, muitos pesquisadores afirmaram que formigas atraídas pelos nectários extraflorais (NEFs) protegem a planta, mas falharam em mostrar, experimentalmente, evidências que suportassem tais conclusões (BENTLEY, 1977). Entretanto, em 1966, JANZEN apresentou os primeiros dados experimentais na América Central que demonstraram efetivamente uma relação obrigatória entre *Acacia cornigera* L. e *Pseudomyrmex ferruginea*. A planta oferece espaço físico para construção de ninhos (domácias), alimento na forma de corpos protéicos (também conhecidos com corpos Beltianos) e açúcares provenientes dos NEFs em troca de proteção contra herbívoros, a poda de espécies de plantas competidoras e possível benefício contra a ação do fogo (JANZEN, 1966).

Quando a interação planta-formiga é mencionada, comumente envolvem-se conceitos mutualísticos, considerando-se que mutualismo seja a relação que beneficia ambas as espécies participantes (EDWARDS & WRATTEN, 1981, BRONSTEIN, 2009). Nem todos os trabalhos que demonstram uma relação positiva entre plantas e formigas propõem um mutualismo obrigatório como o descrito por JANZEN (1966). A maioria dos exemplos corresponde a um mutualismo facultativo, de grande importância para o entendimento do processo evolutivo contínuo (FIALA *et al.*, 1994). Para alguns estudiosos, isso se deve às diferenças comportamentais dentre as várias espécies de formigas, e principalmente no que se refere à sua agressividade, fator que influencia a sua taxa de forrageamento e defesa de recursos pelas formigas (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990). Essas características são fundamentais para compreensão de interações mutualísticas entre formigas e plantas (e.g. BRONSTEIN, 1994, RICO-GRAY & OLIVEIRA, 2007)

1.4- Os Trópicos

BENTLEY (1976) sugeriu que, nos trópicos, as interações mutualísticas entre plantas e formigas são mais comuns do que nas regiões temperadas, pois há maior abundância de formigas e de plantas com NEFs do que nas regiões temperadas. Vários

autores testaram essa hipótese (SCHEMSKE, 1982; TEMPEL, 1983; KOPTUR, 1984; OLIVEIRA et al., 1987; KOPTUR & LAWTON, 1988; OLIVEIRA, 1988; OLIVEIRA & BRANDÃO, 1991), e estimaram que a abundância de plantas com NEFs varia de 0 a 80% em ambientes tropicais (BENTLEY, 1976) contra 0 a 14% em ambientes temperados (KEELER, 1981).

1.5- O Cerrado

O Cerrado, situado principalmente no Planalto Central é o segundo maior bioma do Brasil em área, excedido apenas pela Floresta Amazônica. Abrange os estados de Goiás, Tocantins e o Distrito Federal totalmente, parcialmente os estados do Ceará, Maranhão, Piauí, Rondônia, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, São Paulo e Minas Gerais e ocorre em manchas nos estados do Paraná, Pará, Amazonas, Amapá e Roraima, ocorrendo em altitudes que variam de 300 à 1600 m (LOPES, 1984; OLIVEIRA & OLIVEIRA-FILHO, 1991; EITEN, 1994, OLIVEIRA-FILHO & RATTER, 2002). Somando, ocupa aproximadamente 2.000.000 Km², o que corresponde a 23% do território brasileiro (IBGE, 2006).

Este complexo vegetacional possui relações ecológicas e fisionômicas com outras savanas da América Tropical, África e Austrália (EITEN 1972; 1994; HOPPER *et al* 1996). O Cerrado pode ser dividido em gradientes fitofisionômicos, determinados por variações locais (aspectos físicos e químicos do solo, geomorfologia e topografia) e eventos temporais. Sendo assim, a vegetação deste apresenta fisionomias que conglomeram formações florestais e principalmente campestres e savânicas (RIBEIRO & WALTER, 1998).

WARMING (1973), indicou o clima como o fator determinante das formações campestres e savânicas, onde a deficiência hídrica no período seco seria o principal fator (NEI, 1973). ALVIM (1996) corroborou as observações de Warming, porém, identificaram-se aspectos edáficos e a ação do fogo como fatores que influenciam direta ou indiretamente as espécies vegetais nas diferentes características fisionômicas dos cerrados. São descritos onze tipos fitofisionômicos gerais enquadrados em formações florestais (Mata Ciliar, Mata de Galeria, Mata Seca e Cerradão), savânicas (Cerrado *sentido restrito*, Vereda, Palmeiral e Parque de Cerrado) e campestres (Campo Limpo, Campo Sujo e Campo Rupestre), sendo que alguns apresentam subtipos (OLIVEIRA-FILHO & RATTER, 2002).

O Cerrado *sentido restrito* é caracterizado pela presença de árvores baixas, inclinadas, tortuosas, com ramificações retorcidas e irregulares, e geralmente com

evidências de queimadas (súber carbonizado). Os arbustos e subarbustos encontram-se espalhados, com algumas espécies apresentando órgãos subterrâneos perenes, os quais permitem a rebrota após o fogo (COUTINHO, 1990a, 1990b, 1994).

1.5.1- O Cerrado como modelo

O Cerrado é a savana tropical com maior diversidade de espécies do planeta, no entanto, a maioria dos estudos nesse ecossistema visa obter dados sobre sua utilização para atividades agrícolas (OLIVEIRA & MARQUIS, 2002). É apontado hoje por órgãos nacionais e internacionais como um dos ecossistemas mais ameaçados da Terra, os chamados *hot spots*. Esses argumentos demonstram a importância de estudos nesse ambiente.

OLIVEIRA & LEITÃO-FILHO (1987) observaram, em nove áreas de diferentes tipos de cerrado de São Paulo, que NEFs são bem distribuídos na flora lenhosa. Um total de 44 espécies dentro de 17 famílias foi registrado. OLIVEIRA & OLIVEIRA-FILHO (1991) realizaram estudos em diferentes tipos de vegetação, entre eles no estado de Mato Grosso. Os resultados mostraram que 37 espécies de plantas de 26 gêneros e 17 famílias eram extranectaríferas. Estes estudos adicionaram várias espécies e gêneros às listas de plantas que portam NEFs, tornando possível comparar e observar a ocorrência de famílias em comum com levantamentos realizados em outras formações savânicas por BENTLEY (1977) e ELIAS (1983). Somando tudo isso, plantas com NEFs podem representar mais de 31% dos indivíduos presentes em uma área de cerrado e estarem presentes em 25% das espécies lenhosas da flora arbórea em diversas partes vegetais (OLIVEIRA & OLIVEIRA-FILHO, 1991).

São relativamente recentes os trabalhos envolvendo interações entre formigas e plantas com nectários extraflorais e sua possível função no Cerrado (OLIVEIRA *et al.* 1987 ;COSTA *et al.*, 1992; DEL-CLARO & OLIVEIRA, 1993; DEL-CLARO *et al.*, 1996; OLIVEIRA, 1997; KORNORFER & DEL-CLARO 2006).

1.6 – Os modelos de coevolução

Sistemas “formigas-plantas-outros artrópodes” têm sido apontados como modelos para uma melhor compreensão da “biodiversidade interativa” (THOMPSON, 1997; 2005). A diversidade de relações bióticas em uma dada localidade parece ser a ferramenta fundamental para o desenvolvimento de estratégias para a manutenção da viabilidade das comunidades naturais (THOMPSON, 2005; OLIVEIRA & DEL-CLARO, 2005). Ao que parece, relações mutualísticas são exemplos de coevolução entre espécies

ou grupos de espécies, havendo grande conservacionismo filogeográfico e filogenético nessas associações (THOMPSON, 2005). No entanto, tais aspectos não foram investigados até o momento para associações entre formigas-plantas e, em especial, nos trópicos americanos.

Embora o Cerrado seja um bioma bem definido, ocupando originalmente 23% do território brasileiro, poucos estudos têm examinado as relações entre plantas e insetos nesse bioma. OLIVEIRA *et al.* (1987) foram os primeiros a estudar plantas com NEFs no Cerrado. COSTA *et al.* (1992) e DEL-CLARO *et al.* (1996) demonstraram que formigas diminuem significativamente a herbivoria foliar e de botões florais. Revisões recentes (OLIVEIRA *et al.*, 2002; OLIVEIRA & FREITAS, 2004; OLIVEIRA & DEL-CLARO, 2005) têm rediscutido esses estudos oferecendo novas informações, indicando que plantas com NEFs no Cerrado podem servir como excelente material para os estudos investigativos sobre o conservacionismo filogeográfico e filogenético nas relações mutualísticas, como proposto por THOMPSON (2005).

Algumas regiões vizinhas mostram padrões muito diferentes de diferenciação molecular. Em estudos na Europa e no noroeste dos Estados Unidos, as populações de algumas espécies mostram diferenciação regional relativamente pequena na sequência de DNA, quando comparadas com mais populações do sul que foram menos afetadas pelas placas de gelo do Pleistoceno (BROWN *et al.* 1997; SOLTIS e SOLTIS 1999; AVISE 2000; HEWITT 2001; CALSBEEK, THOMPSON, e RICHARDSON 2003). Em muitos casos estas populações do norte resultaram de uma rápida expansão pós-Pleistoceno, a qual permitiu pouco tempo para a diferenciação molecular em posições neutras de DNA. Baixos níveis de diferenciação molecular regionais, às vezes encontrados nestes estudos, não sugerem automaticamente uma falta de diferenciação em caracteres sob seleção ao longo da variação geográfica de uma espécie.

As variedades geográficas em constante mudança e a relativa diversidade de espécies se inserem como matéria prima para o mosaico geográfico de coevolução. A intervenção humana complica qualquer interpretação simples destas variações geográficas. À medida que aprendemos mais sobre a filogenia das espécies que interagem em décadas recentes, tem se tornado evidente que simplesmente optar por não participar de uma interação não é uma opção viável comumente para a maioria dos táxons. Grandes saltos filogenéticos, que permitem às espécies interagirem com táxons muito diferentes daqueles que seus ancestrais encararam, são relativamente incomuns. A opção mais viável, ao contrário da extinção, é a coevolução com o pequeno subgrupo de táxons com que o ancestral de sua espécie tenha coevoluído. Estas espécies intimamente

relacionadas geralmente diferem fenotipicamente e ecologicamente umas das outras de formas relativamente pequenas (HARVEY 1996; HEDDERSON E LONGTON 1996; SILVERTOWN, FRANCO E HARPER 1997; CLAYTON *et al.* 2003). Isto não significa de forma alguma que há pouca variação sobre a qual a seleção natural possa agir. Isto significa que a evolução das interações é mais compelida ao longo de algumas trajetórias do que outras.

O conservacionismo filogenético também molda a fundação geográfica das interações interespecíficas limitando a gama de habitats disponíveis para as espécies. Estas diferenças comportamentais também estão associadas com diferenças morfológicas e fisiológicas entre espécies. A coevolução é inerentemente um processo genético e ecológico que mistura conservacionismo filogenético com novas oportunidades entre os ambientes complexos. Mais ainda, algumas formas de interação (por ex. mutualismos dispersos) inerentemente coevoluem em direção a redes interespecíficas de espécies filogeneticamente não relacionadas, criando muitas oportunidades para novas interações dentro das mais amplas restrições.

Muitas das características morfológicas e comportamentais não são únicas, reforçando a observação do conservacionismo filogenético em interações interespecíficas. As interações se encaixam dentro de redes mais amplas que variam em estrutura ecológica e resultados ao longo dos ambientes, permitindo a coevolução apenas dentro de um subgrupo de comunidades locais. O desafio é entender como a coevolução procede quando populações locais interagem com uma variação grande de outras espécies, e muitas delas “ativam” a seleção sobre uma interação.

Justificativa e objetivos gerais

Ouratea spectabilis Engl. (Ochnaceae) é uma planta de porte arbóreo (Figura 1 A e B), com altura entre dois à sete metros de altura, comum em várias fisionomias de Cerrado, tendo sua floração entre agosto e novembro (Figura 1 C e D) (LORENZI, 2002). Suas folhas não apresentam sincronia na brotação e são frequentemente alvos de herbívoros. Pelo fato de possuir NEFs ativos nas estípulas dos ramos jovens, atraem comumente formigas diurnas e noturnas. Por essas características *O. spectabilis* torna-se um objeto de investigação atraente para testar a Teoria dos Mosaicos Geográficos da Coevolução.

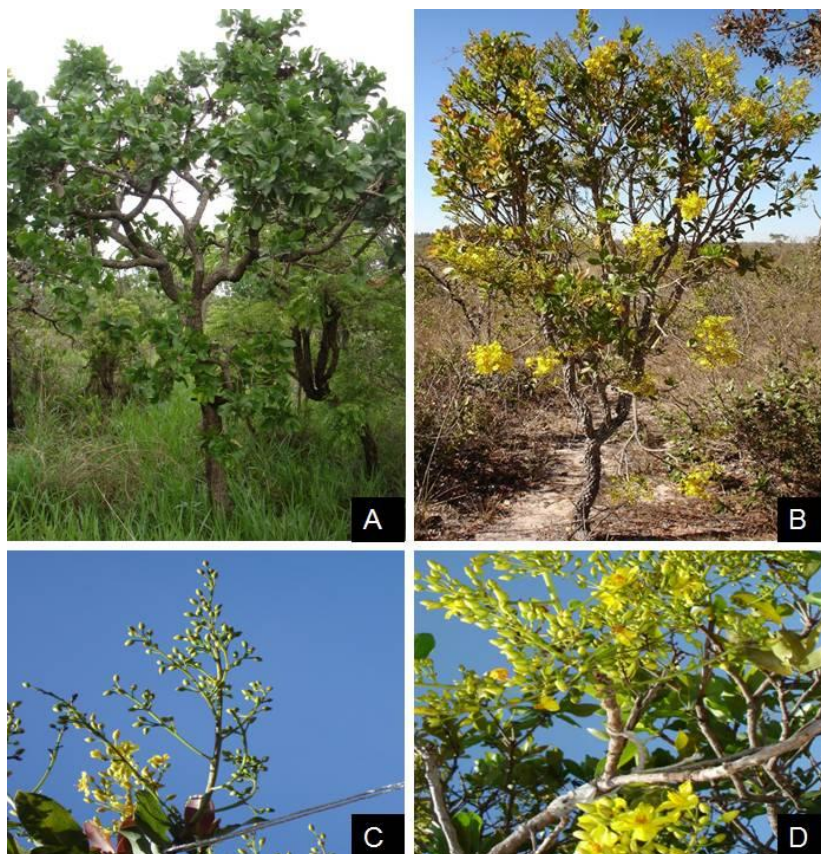


Figura 1. *Ouratea spectabilis*. A) Planta em fase vegetativa; B) a mesma planta em período de floração. C) botões florais; D) flores.

Seguindo-se à revisão teórica acima e considerando-se que:

- NEFs são modelos muito interessantes para estudos de relações multitróficas, tanto pela quantidade de espécies que podem estar relacionadas nos sistemas, bem como pelas variações que podem apresentar (resultados condicionais) (OLIVEIRA & FREITAS, 2004);
- o Cerrado possui uma diversidade de formigas, herbívoros e plantas extra-nectaríferas significativa. Por apresentar vegetação mais baixa e aberta quando comparada a florestas, por exemplo, torna-se um ecossistema especialmente atraente para estudos de interações (DEL-CLARO, 2004);
- *Ouratea spectabilis* ocorre em várias fisionomias de Cerrado, possui reprodução anual e sincronizada. Suas folhas são constantemente atacadas por herbívoros, embora muitas formigas visitem seus nectários extraflorais (LORENZI, 2002; BYK, 2006),
- os NEFs de *O. spectabilis* efetivamente atraem formigas que a protegem contra a ação de herbívoros (FERREIRA, 1994; BYK, 2006);
- este modelo permite testar duas premissas da teoria dos mosaicos geográficos

de coevolução: 1) de que as espécies são grupos de populações geneticamente diferenciadas, e a maioria das espécies que interagem não têm variações geográficas e 2) que as espécies são filogeneticamente conservativas em suas interações, e este conservacionismo geralmente traz relações interespecíficas por longos períodos de tempo.

2. Objetivo Geral

-Avaliar a condicionalidade dos resultados na interação *O. spectabilis* -formigas-herbívoros do ponto de vista sazonal, espacial e os fatores bióticos, além de verificar o conservacionismo filogeográfico das espécies interagentes.

Assim sendo, com base na revisão teórica, em nossas considerações e nas questões propostas, as principais hipóteses desse projeto são:

- 1- há condicionalidade, dependente de variação sazonal, espacial (ao longo do gradiente ambiental) e de fatores bióticos (como espécies de formigas e herbívoros), nas interações observadas entre *O. spectabilis*-herbívoros-formigas no Cerrado;
- 2- há conservacionismo filogenético ao longo da variação geográfica com implicações no resultado das interações *O. spectabilis*-herbívoros-formigas, conforme sugerido por THOMPSON (2005).

A presente tese tem como objetivo contribuir para o conhecimento das espécies e suas relações. Para tanto, foi dividida nos seguintes capítulos:

Capítulo I: Através de manipulação experimental, tentamos demonstrar o quanto é benéfico para as formigas se alimentarem em NEFs e mostrando o benefício direto sobre o valor adaptativo das colônias.

Capítulo II: Mostra que o comportamento desta espécie, *Cephalotes pusilus*, e as limitações biológicas deveriam ser consideradas antes de generalizações sobre formigas visitantes de NEFs e suas capacidades defensivas. Mostramos o caso de *C. pusilus* uma espécie que recebe benefícios, mas não presta serviço algum a planta;

Capítulo III: Através do levantamento de dados das duas premissas da Teoria dos Mosaicos de Coevolução, verificamos a variação ao longo do tempo

(sazonal/anual) nos benefícios conferidos pelas formigas visitantes dos NEFs de *Ouratea spectabilis* contra a ação de herbívoros. Se os benefícios se restringem à redução da herbivoria foliar, ou também repercutem sobre o valor adaptativo das plantas (proteção a botões, flores e frutos) e com isso mostrar que espécies que interagem não apresentam variações geográficas e são filogeneticamente conservativas em suas interações e por longos períodos.

3 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALA-ROBERTS, L. & V. PARRA-TABLA (2005). **Artificial defoliation induces trichome production in the tropical shrub *Cnidoscolus aconitifolius* (Euphorbiaceae)**. *Biotropica* 37: 251-257.
- ALVIM, P. DE T. (1996) **Repensando a teoria da formação dos campos Cerrados**. In: Simposio Sobre o Cerrado, VIII. Simpósio Internacional Sobre Savanas Tropicais, 1, Brasília – DF. Embrapa – CPAC. p 56-85.
- AVISE, J. C. (2000) **Phylogeography: The history and formation of species**. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- BENTLEY, B.L. (1976) **Plants bearing extrafloral nectaries and the associated ant community: interhabitat differences in the reduction of herbivore damage**. *Ecology* 57:815-820.
- BENTLEY, B. L. (1977) **Extrafloral nectarines and protection by pugnacious body guards**. *Annual Review of Ecological Systematics*, 8: 407-427.
- BEQUAERT, J. (1922) **Ants in their diverse relation to the plant world**. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 45:333-583.
- BOUCHER, D.H., JAMES, S. & KEELER, K.H. (1982) **The Ecology of Mutualism**. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 13:315-347.
- BRONSTEIN. J.L. (2008) **Our current undertending of mutualism**. *Quarterly Review of biology* 69:31-51.
- BRONSTEIN, J. L.(2009). **The evolution of facilitation and mutualism**. *Journal of Ecology*. p.1-11.
- BROWN , J.M., J.H. LEEBENS-MACK, J.N. THOMPSON, O. PLLMYR & R.G. HARRISON, (1997) **Phylogeography and host association in a pollinating seed parasite *Greya politella* (Lepidoptera: Prodoxidae)**. *Molecular Ecology* 6:215-224.

- BYK, J. (2006) **Interações entre formigas e *Ouratea spectabilis* (Ochnaceae) na vegetação de cerrado: variação sazonal e efeito do fogo.** Diss Mestrado. UFJF. 37p.
- CALSBEEK, R.; THOMPSON J.N. & RICHARDSON , J.E. (2003) **Patterns of molecular ecolution and diversification in a biodiversity hotspot: the California Floristic Province.** *Molecular Ecology* 12:1021-1029.
- CLAYTON, D. H.; BUSH, B.; GOATES, M.& JOHNSON, K. P.. (2003) **Host defense reinforces host-parasite cospeciation.** *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 100: 15694 – 15699.
- COSTA, F.M.C.B.; OLIVEIRA-FILHO, A.T. & OLIVEIRA, P.S. (1992) **The role of extrafloralnectaries in *Qualea grandiflora* (Vochysiaceae) in limiting herbivory: an experiment of ant protection in cerrado vegetation.** *Ecological Entomology* 17:363-365.
- COUTINHO, L. M. (1990a) **Fire ecology of the Brazilian cerrado.** *Fire in the Tropical Biota* (ed. by J. G. Goldammer), pp. 82–105. Springer-Verlag, Berlin
- COUTINHO, L.M. (1990b) **O cerrado e a ecologia do fogo.** *Revista Ciência Hoje*, vol.12, n.68, p.23-29.
- COUTINHO, L.M.(1994) **O uso do fogo em pastagens naturais.** In: *Utilizacion y manejo de pastizales*. Ed. Puignau, J.P. Ururuguaí, Montevideo, IICA_PROCISUR, N 40. P. 159-168
- CUAUTLE, M. & RICO-GRAY.V.(2003). **The effect of wasps and ants on the reproductive success of the extrafloral nectaried plant *Turnera ulmifolia* (Turneraceae).** *Fun. Ecol.* 17: 417-423.
- DEL-CLARO, K. & OLIVEIRA, P.S. (1993) **Ant-homoptera interaction: do alternative sugar source distract tending ants?** *Oikos* 68 (2): 202-206.

- DEL-CLARO, K.; BERTO, V. & RÉU, W. (1996) **Effect of herbivore deterrence by ants on the fruit set of an extrafloral nectary plant, *Qualea multiflora* (Vochysiaceae).** Journal of Tropical Ecology 12: 887-892.
- DEL-CLARO K (2004) **Multitrophic relationships, conditional mutualisms, and the study of interaction biodiversity in tropical savannas.** Neotrop Entomol 33: 665-672.
- EDWARDS, P. J. & WRATTEN, S. D. (1981) **Ecologia das interações entre plantas e insetos.** Coleção Temas de Biologia, vol. 27. EPV, São Paulo, SP. p. 1 - 56.
- EITEN, G. 1994. **Vegetação.** In: *Cerrado – Caracterização, Ocupação e Perspectivas.* M. N. Pinto (org.). 2ª ed. Editora UnB. p 17-73.
- ELIAS, T.S. **Extrafloral nectaries: their structure and distribution.** In: *The Biology of nectaries* (Bentley, B.L., Elias, T.S. eds), Columbia Univ. Press, New York, 1983, 259p.
- FERREIRA, S.O. 1994. **Nectários Extraflorais de *Ouratea spectabilis* (Ochnaceae) e A Comunidade de Formigas Associadas: Um Estudo Em Vegetação de Cerrado No Sudeste do Brasil.** Diss.Mestrado. UNICAMP. 81p.
- FIALA, B. (1990) **Extrafloral nectaries versus ant-Homoptera mutualism: a comment on Becerra and Venable.** *Oikos* 59:281-281.
- GILL.A.M. (1975) **Fire and the Australian flora: a review.** Australian Forestry, v38,p.4-25,
- HARVEY, P. H. (1996) **Phylogenies for ecologists.** Journal of Animal Ecology 65: 255-263.
- HEDDERSON, T. A.& LONGTON. R. E. (1996) **Life history variation in mosses: Water relations, size and phylogeny.** *Oikos* 77: 31-43.

- HEIL, M., AND MCKEY. (2003) **Protective ant-plant interactions as model systems in ecological and evolutionary research.** Annual Review of Ecology and Systematics 34:425-453.
- HEWITT, G. M. (2001) **Speciation, Hybrid zones and Phylogeography – or seeing genes in space and time.** Molecular Ecology 10: 537-549.
- HÖLDOBLER, B. & WILSON, E. O. (1990) **The ants.** Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- HOPPER, S.D.; HARVEY, M.S.; CHAPPILL, J.A.; MAIN, A.R. & YORK MAIN, B. (1996) **The Western Australian biota as Gondwanan heriage – a review.** In Hopper, S. D. (Eds). Gondwana heriarte: Past, present and future or Western Australia biota. Chipping Norton:Surrey Beaty & Sons, p.1-46.
- IBGE (1993) **Mapa de Vegetação do Brasil.** Ministério do Planejamento e Orçamento.
- IBGE (2004) **Vocabulário Básico de Recursos Naturais e Meio Ambiente.** 2ª Edição. Rio de Janeiro, Instituto brasileiro de Geografia e Estatística.
- JANZEN, D. H. (1966) **Coevolution of mutualism between ants and acacias in Central America.** Evolution 20: 249-275.
- JANZEN, D. H. (1975). **Ecology of Plants in the Tropics,** Edward Arnold, London.
- JANZEN, D. H. (1980) **When is it coevolution?** Evolution 34: 611-612.
- KEELER, K. H. (1981) **A model of selection for facultative nonsymbiotic mutualism.** *American Naturalist* 118: 488-498.
- KEELER, K. H. (1989) **Ant-plant interactions.** In W. G. Abrahamson (Ed.). Plant-animal interactions, pp. 207-242. McGraw-Hill, New York, 480 pp.
- KOPTUR, S. (1984) **Experimental evidence for defense of *Inga* (Mimosoideae) saplings by ants.** Ecology 65 (6): 1787-1793.

- KOPTUR, S. & LAWTON, J.H. (1988) **Interactions among vetches bearing extrafloral nectaries, their biotic protective agents, and herbivores.** *Ecology* 69: 278-283.
- KORNDÖRFER, A. P. & DEL-CLARO, K. (2006) **Ant defense versus induced defense in *Lafoensia pacari* (Lythraceae), a myrmecophilous tree of the Brazilian cerrado.** *Biotropica* 38: 786-788.
- LAMONT, B.B. (2005) **Sandplain couty of southwestern Australia.** In : Proceedings of the Seminar Program and AJ Swaby Address from the 23rd Bienal Conference And Seminar of the Association of Societes for growing Australian Native Plants.
- KORCZYNSKYJ, D. & LAMONT, B.B. (2005) **Grasstree (*Xanthorrhoea preissii*) recovery after fire in two seasons and habitats.** *Australian Journal of Botany* 53, 509-515.
- LOPES, B.C. **Aspectos da Ecologia de membracideos (Insecta: Homoptera) em vegetação decerrado do Estado de Sao Paulo, Brasil.** UNICAMP. Diss. Mestrado. 62p
- LORENZI, H. (2002) **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil.** Ed. Plantarum LTDA, Odessa, Brasil.
- MAIORANA, V. C. (1978) **What Kinds of plants do herbivores really prefer?** *The American Naturalist*, 112, 631 - 5.
- MARQUIS, R.J. & H.E. BRAKER. 1994. **Plant-herbivore interactions: diversity, specificity, and Impact**, p. 261-281. In: L.A. McDade, K.S. Bawa, H.A. Hespenheide & G.S. Hartshorn (eds.), *La Selva: Ecology and Natural History of a Neotropical Rain Forest*. Chicago, Chicago Press, 486p.
- MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSAECA, G.A.B. & KENT, J. (2000) **Biodiversity hotspots for conservation priorities.** *Nature* 403: 853-858

- NEI, M. (1973) **Analysis of gene diversity in subdivided populations**. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 70 :3321-3323.
- OLIVEIRA, P. S. & BRANDÃO, C. R. F. (1991) **The ant community associated with extrafloral nectaries in the brasilian cerrados**. Pp. 198-212 (Chapter 14) in Huxley, C. R. & Cutler, D. F. *Ant-plant interactions*. Oxford University Press, Oxford.
- OLIVEIRA, P. S. & DEL-CLARO, K. (2005) **Multitrophic interactions in a Neotropical savanna: ant-hemiptera systems, associated insect herbivores, and a host plant** in *Biotic Interaction in the Tropics* (D. Burslem ed.). Cambridge University Press, British Ecological Society, London, 564p.
- OLIVEIRA, P. S. & FREITAS, A. V. L. (2004) **Ant-plant-herbivore interactions in the Neotropical cerrado savanna**. *Naturwissenschaften* 91: 557-570.
- OLIVEIRA, P.S. & LEITÃO-FILHO, H.F. (1987) **Extrafloral nectaries: Their taxonomic distribution and abundance in the woody flora of cerrado vegetation in Southeast Brazil**. *Biotropica*, 19: 140-148.
- OLIVEIRA, P. S. & MARQUIS, R. J.(2002) **The cerrados of Brazil: Ecology and natural history of a Neotropical savanna**. Columbia University Press, New York, 398p.
- OLIVEIRA, P. S. & OLIVEIRA-FILHO, A. T. (1991) **Distribution of extrafloral nectaries in the woody flora of tropical communities in the western Brazil**. In: *Plant-animal interactions: evolutionary ecology in tropical and temperate regions*. Ed. John Wiley & Sons, New York. p. 163-175.
- OLIVEIRA, P. S. AND PIE, M. R. (1998) **Interaction between ants and plants bearing extrafloral nectaries in Cerrado vegetation**. *An. Soc. Entomol. Brasil* 27 (2): 161-176.

- OLIVEIRA, P.S. & LEITÃO-FILHO, H.F. (1987) **Extrafloral nectaries: Their taxonomic distribution and abundance in the woody flora of cerrado vegetation in Southeast Brazil**. *Biotropica*, 19: 140-148.
- OLIVEIRA, P.S.; FREITAS, A.V.L.; & DEL-CLARO, K. , (2002) **Ant foraging on plant foliage: contrasting effects on the behavioral ecology of insect herbivores**. In: OLIVEIRA, P.S. & MARQUIS, R.J. (Eds.). *The Cerrados of Brazil: ecology and natural history of a neotropical savanna*. New York: Columbia University Press. p.287-305.
- OLIVEIRA, P.S., SILVA, A.F. DA & MARTINS, A.B. (1987) **Ant foraging on extrafloral nectaries of *Qualea grandiflora* (Vochysiaceae) in cerrado vegetation: ants as potential antiherbivore agents**. *Oecologia* 74: 228-230.
- OLIVEIRA, P.S. (1997) **The ecological function of extrafloral nectaries: herbivore deterrence by visiting ants and reproductive output in *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae)**. *Functional Ecology* 11: 323-330.
- OLIVEIRA-FILHO, A. T. & RATTER, J. A. (2002) **Vegetation physiognomies and woody flora of the cerrado biome**, p.91-120. In Oliveira P S, Marquis R J (eds) *The cerrados of Brazil: ecology and natural history of a neotropical savanna*. Columbia University Press, New York, 398p.
- PEMBERTON, R. W. (1992) **Fossil extrafloral nectarines, evidence for the ant-guard antiherbivore defense in an Oligocene *Populus***. *Amer J Bot* 79: 1242-1246.
- RIBEIRO, J.F. & WALTER, B.M.T. (1998). **Fitofisionomias do bioma Cerrado**. In: Sano SM, Almeida SP (eds) *Cerrado: ambiente e flora*. Planaltina, EMBRAPA. 556pp.
- RICO-GRAY, V. & OLIVEIRA, P. S (2007) **The ecology and evolution of ant-plant interactions**. University of Chicago Press, Chicago.

- SCHEMSKE, D.W. (1980) **The evolutionary significance of extrafloral nectar production by *Costus woodsonni* (Zingiberaceae): An experimental analysis of ant protection.** J. Ecol. 68: 959-967.
- SILVERTOWN, J., M. FRANCO & J.L.HARPER, eds. (1997); **Plant life histories: ecology, phylogeny, and evolution.** Cambridge University Press, Cambridge.
- SOLTIS, D.E. AND SOLTIS, P.S. (1999) **Polyploidy: Recurrent formation and genome evolution.** Trends in Ecology and Evolution 14:348-352.
- TEMPEL, A S. (1983) **Braken fern (*Pteridium aquilinum*) and nectar feeding ants: a non-mutualistic interaction.** *Ecology* 64: 1411-1422.
- THOMPSON, J. N. (1994) **The coevolutionary process.** The University of Chicago Press, Chicago, 376p.
- THOMPSON, J.N. (1997) **Conserving interaction biodiversity,** p. 285-293. In S.T.A. Pickett, R.S. Ostfeld, M. Shachak, & G.E. Likens (eds.), *The Ecological Basis of Conservation: Heterogeneity, Ecosystems, and Biodiversity.* Chapman & Hall, New York, 437p.
- THOMPSON, J.N. (1999) **Coevolution and escalation: are ongoing coevolutionary mechanisms important?** *American Naturalist* 153: S92-S93
- THOMPSON, J.N. (1999b), **Specific hypotheses on the geographic mosaic of coevolution.** *American Naturalist* 153:S1-S14.
- THOMPSON, J.N. (2001) **The geographic dynamics of coevolution.** Pages 331-343 in C.W. Fox D.A. Roff, and D.J. Fairbairn, eds., *Evolutionary Ecology: Concepts and Case Studies.* Oxford University Press, Oxford.
- THOMPSON, J.N. & CUNNINGHAM, B.M. (2002). **Geographic structure and dynamics of coevolutionary selection.** *Nature* 417:735-738.

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

WADE, M.J. & GOODNIGHT, C.J.(1998) **The theories of fisher and Wirigth in the context of metapopulations**: When nature does many small experiments. *Evolution* 52:1537-1553.

CAPITULO I

Efeitos diretos de néctar extra floral sobre o fitness de formigas: evidência de um estudo a longo prazo

RESUMO

Estudos que mostram benefícios de formigas para plantas que possuem nectários extraflorais (NEFs) são predominantes na literatura. Mas não se sabe como e quanto as formigas se beneficiam ao utilizarem o néctar extrafloral (NEF) na sua dieta e qual o efeito sobre o fitness de formigas. Apresentamos os resultados de um estudo, de longo prazo, em ambiente de laboratório, para demonstrar que o néctar extrafloral tem um efeito positivo sobre o fitness de colônias de formigas. Para este estudo usamos colônias de *Cephalotes pusillus* e arbustos de *Chamaecrista desvauxii* (Caesalpinioidea) que possui NEFS no pecíolo. Cada ninho de formiga foi acondicionado em uma bacia plástica com resina em suas bordas e adicionado um vaso contendo um arbusto. Grupos controle (N= 11) tiveram os nectários extraflorais intactos, enquanto grupos tratamento (N=11) tiveram os NEFs necrosados. Ambos os grupos receberam a dieta de Bhatkar & Witcomb. Cada colônia iniciou com uma rainha, dois soldados, três operárias e cinco ovos. O experimento foi conduzido por um ano. A análise de concentração de açúcar de NEF revelou que cada glândula produziu ao menos 2,5 microlitros de néctar por dia (N=42 glândulas amostradas, duas glândulas de cada planta), o que correspondeu a 2,16 cal. Ao final, contamos o número de indivíduos de cada colônia (ovos, rainhas, operárias e soldados). O néctar extrafloral teve um impacto significativo e positivo sobre o fitness das formigas. Colônias com acesso aos NEFs desenvolveram-se melhor e produziram número maior de indivíduos e ovos do que colônias nas quais faltava néctar extrafloral. Nossos resultados lançam uma luz nova sobre as relações entre formigas e plantas com NEFs. A formiga *C. pusillus* é o primeiro caso, no qual temos real evidência de que o NEF melhora o crescimento e desenvolvimento da colônia, corroborando com mais de 100 anos de evidência experimental dos benefícios para as plantas, nestas relações amplamente distribuídas.

Palavras-chave: mutualismo, néctar-extrafloral, fitness, benefícios para formigas.

ABSTRACT

Direct effects of extra floral nectar on the fitness of ants: evidence from a long-term study

Studies that show benefits of ants to plants possessing extrafloral nectaries (EFN) are predominant in the literature. But it is unclear how and how much the ants benefit by using the extrafloral nectar (EFN) in their diet and what is the effect on the fitness of ants. We present the results of a long-term study in a laboratory setting, to show that the extrafloral nectar has a positive effect on the fitness of ant colonies. For this study we used *Cephalotes pusillus* colonies and *Chamaecrista desvauxii* (Caesalpinioidea) shrubs that have EFNs in the petiole. Each ant nest was added to a plastic bowl with resin at the edges and added a pot containing a bush. Control groups (N = 11) had the extrafloral nectaries intact, while the treatment groups (N = 11) had the EFNs necrotic. Both groups received a diet Bhatkar & Witcomb. Each colony began with a queen, two soldiers, three operators and five eggs. The experiment was conducted for one year. Analysis of sugar content of EFN gland revealed that each one produced at least 2.5 microliters of nectar per day (N = 42 glands sampled, two glands of each plant), which corresponded to 2.16 cal. Finally, we counted the number of individuals of each colony (eggs, queens, workers and soldiers). The EFN had a significant and positive impact on the fitness of the ants. Colonies fed with EFNs developed better and produced higher number of individuals and eggs than colonies which lacked extrafloral nectar. Our results shed new light on the relations between ants and plants with EFN. The ant *C. pusillus* is the first case where we have real evidence that the EFN enhances the growth and development of the colony, supporting more than 100 years of experimental evidence of benefit to the plants widely distributed in these relationships.

Keywords: mutualism, extrafloral nectar, fitness, benefits to ants.

1 -INTRODUCTION

In communities, the assembly of species is linked directly or indirectly through resources and consumption. One of the biggest questions in ecology is to determinate the distribution and assembly of species (Polis and Winemiller 1996, Borer *et al.* 2005). Thus, works on the direct trophic relationships that influence species interactions and biodiversity are basic to our comprehension of how communities are established and organized (Thompson 2005). Because of this, studies of interactions such as parasitism and mutualism can provide particular insight into community dynamics (Simberloff 2006, Clement *et al.* 2008), and allow us to predict community stability through the study of costs and benefits of related species (Sachs and Simms 2006). Ant-plant relationships have made enormous contributions to our understanding of communities (Bronstein 1998, Rico-Gray and Oliveira 2007 and references therein). The commonest resource plants offer to ants is extrafloral nectar (EF nectar), a liquid substance rich in carbohydrates with dilute concentrates of amino acids (Baker *et al.* 1978). Extrafloral nectaries (EFNs) are present in at least 93 plant families and 332 genera round the world (Koptur 1992). Although few studies have directly investigated the effects of ant-EFN bearing plants on communities, current evidence suggests that EF nectar may influence species composition, abundance, and interactions at the community scale (Rico-Gray *et al.* 1998, Blüthgen *et al.* 2000).

To qualify an interaction as mutualistic, benefits to both participants must be demonstrated (Cushman and Beattie 1991), but is experimentally difficult (Fiedler and Saam 1995, Lach *et al.* 2009). Furthermore, some studies have revealed that ant-plant mutualisms can be exploited by several species, mainly ants (e.g. Janzen 1975, Letourneau 1990), that obtain resources from the plants but provide no services. These species are termed cheaters, exploiters, or parasites of the mutualism (Clement *et al.* 2008). Nevertheless, studies that show benefits from ants to plants possessing EFNs are predominant in the literature (Rico-Gray and Oliveira 2007, Rosumek *et al.*, 2009), but the reciprocal question of whether and how ants benefit from EFNs, as in parasitic as in mutualistic relationships, are rarely addressed (Bronstein 1998, Del-Claro and Torezan-Silingardi 2009, Rosumek *et al.* 2009). We extensively searched in the literature for evidence of benefit to ants that visit ant-EFNs bearing plants, and also ant interactions with tend exudate-secreting insects such as hemipterans and butterfly larvae, or collect seeds, and we found only five published papers that demonstrated clear benefit to the ants. Three studies investigated the benefits of elaiosome-bearing seeds: the first

showed positive effect of elaiosome on gyne abundance (Morales and Heithaus 1998), the second in larval weight and abundance (Gammals *et al.* 2005), and the third in pupal abundance (Fokuhl *et al.* 2007). In a short time experiment, Cushman *et al.* (1994) showed that ants with access to lycaenid butterfly larva had 40% greater survival than workers with access only to plants. More recently, Lach *et al.* (2009) in two short laboratory experiments showed that in EFNs bearing plants, herbivory can induce a higher production of EF nectar that can improve worker survivorship 7-11 times greater than unfed ants. Thus, despite the hundreds of studies on ant-plant interactions, we still lack clear evidence from long-term experimental studies of the effect of EF nectar on colony ant fitness.

Here, we present the results of a long term study, in a controlled laboratory environment, to demonstrate whether EF nectar has a positive effect on ant colony fitness. For this study we used one of the most studied arboreal ant species in the Brazilian tropical savanna, *Cephalotes pusillus* (e.g. Korndörfer and Del-Claro 2006, Sendoya *et al.* 2009) and the EFN-bearing shrub *Chamaecrista desvauxii* (Caesalpinioidea). We hypothesized that ant colonies with access to EFN-bearing plants would have higher fitness than colonies without access, because they would have an additional source of energy from EF nectar. Carbohydrates have been suggested to be key resources for arboreal ants (Davidson *et al.* 2003). We quantified colony growth rate, survival and the final weight of individuals as measures of benefit derived from EF nectar.

2 -MATERIAL AND METHODS

2.1 -Species descriptions

Cephalotes pusillus Klug (Myrmicinae) is a black and polymorphic species, with size differences between workers (3-4mm), soldiers (5-6mm) and gyne (9-11mm). They nest in natural cavities of trees, or in cavities produced by beetles, but can also be found in dead stems or trunks on the ground (Powell 2008). Mature colonies have only one gyne (queen) and about 170 workers (173 ± 19 , $X \pm 1SD$, $N=16$) and 25 soldiers (24 ± 7 , $X \pm 1SD$, $N=16$). These ants have small mandibles and feed primarily plant and insect exudates such as EF nectar and hemipteran honeydew, fallen fruits, feces of birds, dead animal matter, and slow-moving prey (Del-Claro and Oliveira 1999, Davidson *et al.* 2003). Previous field observations showed that in the tropical savanna cerrado, the

reproductive period begins in late September and October, and in December initial nests can be easily found in stems of *Stryphnodendron polyphyllum* (Mimosaceae), *Ouratea spectabilis* and *O. hexasperma* (Ochnaceae).

The genus *Chamaecrista* (Moench) (Caesalpiniaceae) is widely distributed in the tropical savanna, with more than 130 species (Mendonça, et al., 1998), several of them bearing EFNs (Irwin and Barneby, 1982), and only recently studied in terms of the outcomes of ant-plant associations (Nascimento and Del-Claro 2010). The shrub *C. desvauxii* presents yellow flowers and pinnately compound leaves with EFNs in the basis and in the tip of each leaf. This species is common and presents aggregate distribution in the cerrados of Southeast Brazil. These plants have, on average, fourteen extra-floral nectaries and they secrete nectar during all the year

2.2 -Experiments

EF nectar production and quality can vary among plant species, plants of the same species and leaves of the same plant, depending also of season, soil quality and herbivory (Koptur 1992, Heil and McKey 2003). To reduce individual variation in nectar quality and production we collected in the field seeds of one shrub and cultivated it in laboratory conditions (8hs of light, 23-27⁰C, 50-60% humidity) in pots (500ml) previously prepared with the same quantity and quality of soil substrate. Each pot was placed in the right side of a plastic rectangular basin (20 X 30 cm length and 10 cm height), entirely covered by a thin and transparent tulle. These cages (N=30) were prepared between October and November of 2007. Seeds germinated in two weeks and after 45 days (December) we had seedlings with one main branch, 8-10 cm tall. The *C. desvauxii* EFNs produced nectar during the whole day. However, it was more intense in dawn (06:30h) and dusk (17:30h), when we could note a more intense bright in the glands and a liquid accumulation that enabled us to sample it. Thus, to know the contribution of each EFN to the ants in terms of calories, with a microcapillary tube (10µl) we looked for the sugar concentration in a refratometer (Eclipse®). The values recorded are in Brix scale and represent the percentage of sugar per volume, and we converted it to mass, according to Kearns and Inouye (1993). The quantity of nectar found in each EFN was finally converted to calories according to Dafni (1992; 1mg of sugar = 4 cal).

In December of 2007, in cerrado vegetation, we collected nests (N=30) of *C. pusillus* in the initial phase of establishment. They were transported to laboratory and

were conditioned in glass tubes (five per colony; tubes of 10cm long and 1cm diameter, filled up to 2cm with water concealed by hydrophilic cotton). Colonies were fed with water and 5g of protein diet (Bhatkar and Whitcomb 1970) for two weeks. In the last week of December we manipulated colonies that had all castes present (N=22), to obtain in each one the following composition: 1 queen, 3 workers, 2 soldiers and 5 eggs. These colonies were divided, by the flip of a coin, in control or treatment group. In the first week of January of 2008 the colonies were introduced in the cages with seedlings of *C. desvauxii*. In control groups, plants were not manipulated and had actives EFNs, but in the treatment ones, the EFNs were damaged with a needle, to stop nectar production. Control plants were maintained with 14 actives EFNs during all the experiment, and in treatment plants, new EFNs were damaged, causing sclerotization. In both groups, the plants received 30 ml of water and ants were fed with water and 5g of protein diet every two days (Bhatkar and Whitcomb 1970). We followed the colonies for one year, and in December we counted the number of individuals and eggs in each colony. All queens, eggs, workers, soldiers larvae and pupae in each colony were weighed.

Data normality was tested using Kolmogorov-Smirnov test. If normal, mean values were compared using Student's t-test, on the contrary we used Mann-Whitney U-test.

3- RESULTS

EF nectar had a significant and positive impact on ant colony fitness, confirming the main hypothesis and the expected by dozens of studies that presumed ant-EFNs bearing plants interactions as mutualistic character. Colonies fed with EFNs developed better than colonies lacking EFNs, producing a higher number of individuals (Figure 1) and eggs (Figure 2). The analysis of EFN sugar concentration revealed that each gland produced at least 2.5 μ l of nectar per day (N=42 sampled glands, two glands of each plant), what corresponded to 2.16 cal. We could not note variation between EFNs. Because each plant in the control group had 14 active EFNs, we expected that each plant offered to ants at least 7,56 mg of nectar per day or 30.26 cal. This additional energetic supplement had a significant positive impact on the final weight of individuals, queens, workers, soldiers and eggs of control ant colonies (Figure 3).

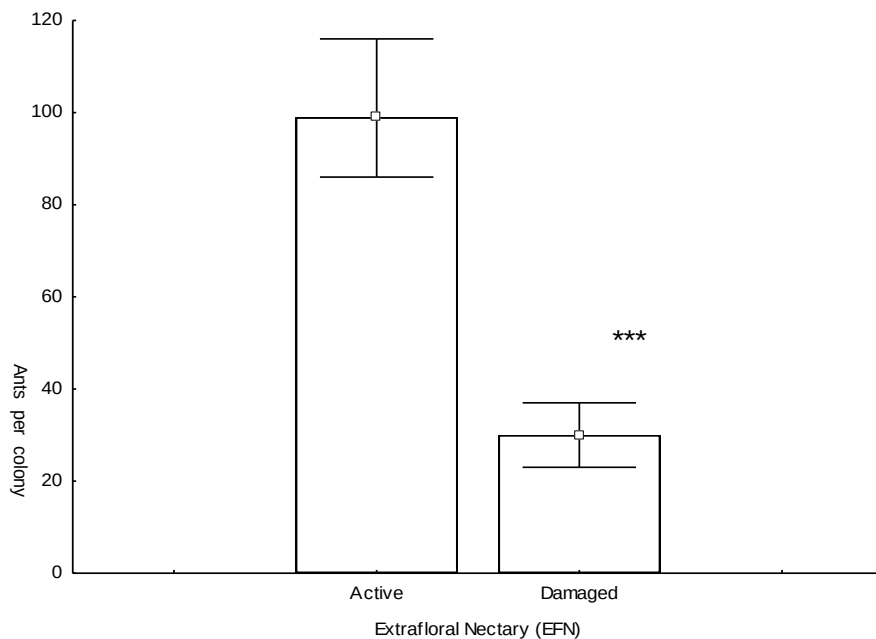


Figure 1. Number of individuals (mean $\pm$ 1SD) in colonies of the ant *Cephalotes pusillus* Klug, 1824 (Myrmicinae) that had access to plants of *Chamaecrista desvauxii* (Caesalpiniaceae) with active EFNs (N=11 control colonies) or plants with damaged and non productive EFNs (N=11 treatment colonies) during one year. *** means statistical difference between groups ($p < 0.0001$, $t = 8,1164$, $df = 20$).

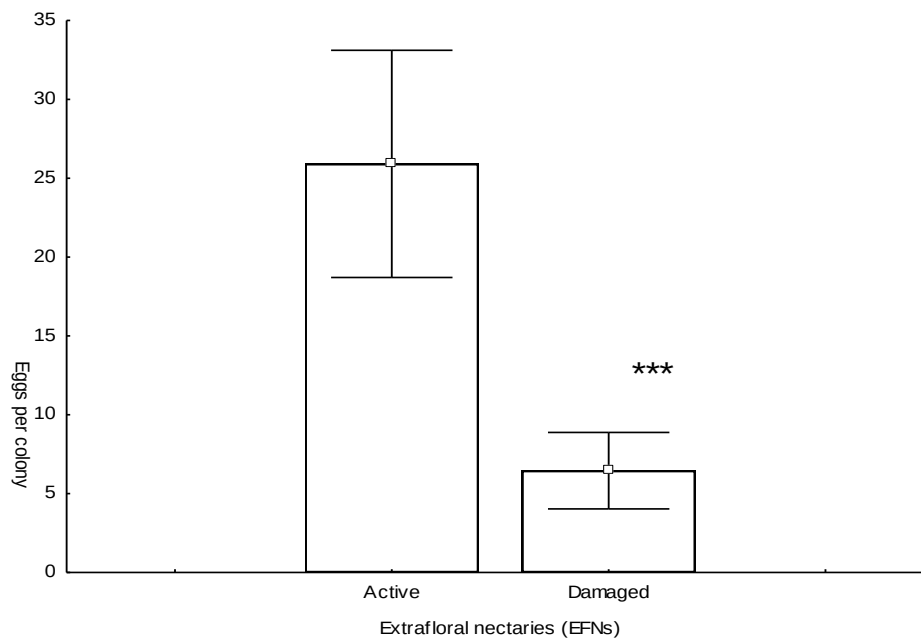


Figure 2. Number of eggs (mean $\pm$ 1SD) in colonies of the ant *Cephalotes pusillus* Klug, 1824 (Myrmicinae) that had access to plants of *Chamaecrista desvauxii* (Caesalpiniaceae) with active EFNs (N=11 control colonies) or plants with damaged and non productive EFNs (N=11 treatment colonies) after one year. *** means statistical difference between groups ($p < 0.0001$, $t = 8.4896$, $df = 20$).

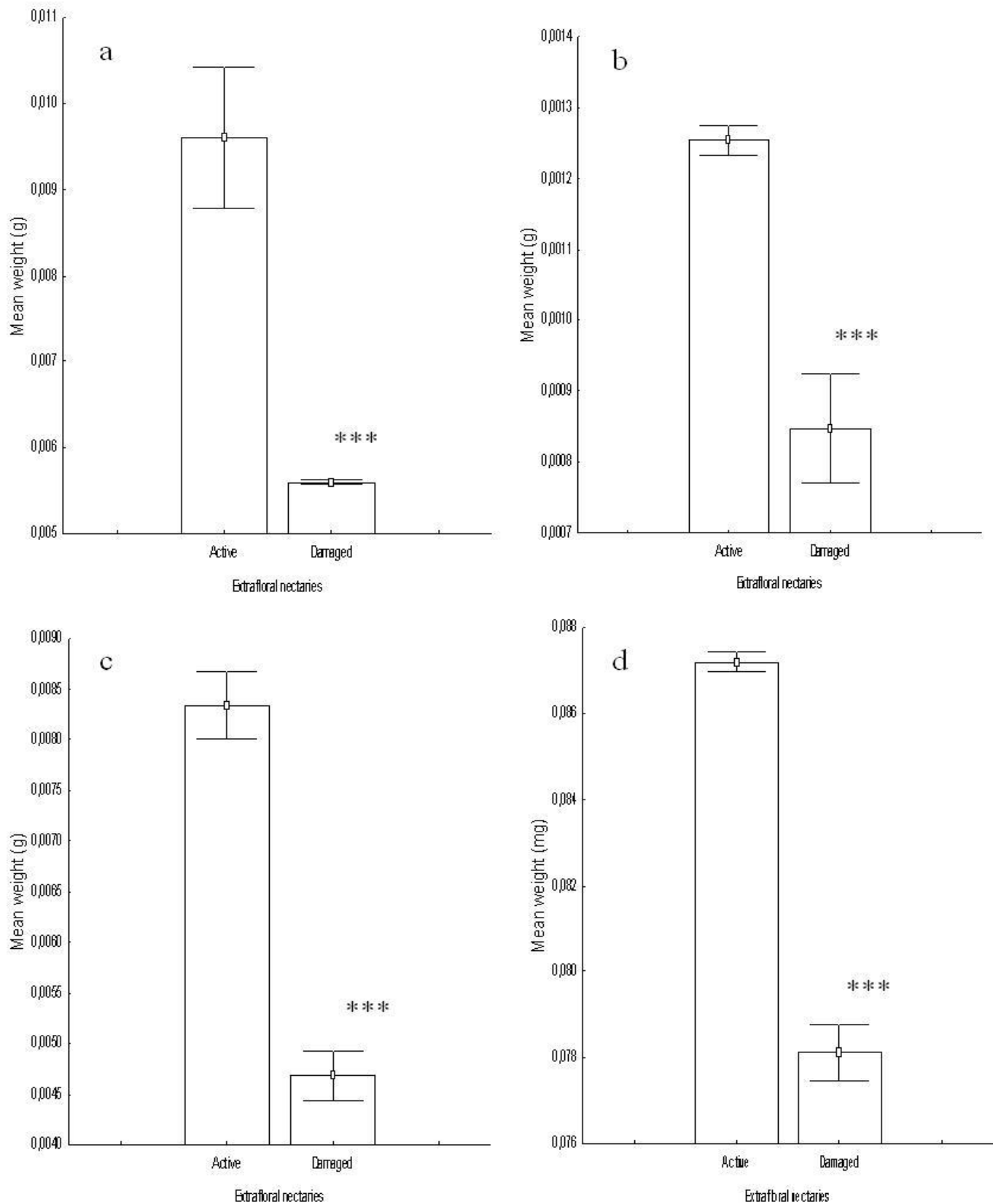


Figure 3. Comparative weight (mean $\pm$ 1 EP; a- queens; b- workers; c- soldiers; d- eggs) of *Cephalotes pusillus* ants bred with access to *Chamaecrista desvauxii* plants with active (control group, N=11) and damaged and non active extrafloral nectaries (treatment group, N=11). *** means statistical difference (p < 0,0001; Mann Whitney U-test).

4 -DISCUSSION

EF nectar effect on ant colonies

Despite the large number of studies that have focused on ant-plant interactions in both temperate and tropical systems (Rosumek *et al.* 2009), our results provide the first evidence that EF nectar have a significant positive impact on the survivorship, growth, development and reproduction of one ant species. In the case of *C. pusillus*, a diet rich in EF nectar (providing at least 30 cal per day) resulted in five times more individuals per colony, greater body weights, and more eggs.

Although EF nectar may vary in production, composition and concentration, both within and among plant species (Heil *et al.* 2000, Blüthgen *et al.* 2004), carbohydrates, mainly sucrose, fructose, and glucose usually comprise the major part ($\geq 90\%$) of nectar (Blüthgen *et al.* 2004). In ant colonies, some authors (Wheeler 1994, Davidson 1998) pointed out carbohydrates as the primary fuel for workers in foraging and defense activities, indirectly benefiting the other castes. The results presented here also show that this benefit can be direct, because worker body weights were significantly higher and energy to the whole colony. Carbohydrates have been hypothesized to be the key resources for maintaining worker activity levels of ecologically dominant *Cephalotes* ant species (Davidson 1998). EF nectar possesses a variety of qualities that place it as a key resource for ants. For example EF nectar is predictable in time and space, and is a reliable source of sugar, water and amino acids (Koptur 1992, Rudgers and Gardner, 2004) that increase many measures of colony fitness, including body size, colony growth rate, and brood growth. By preventing nectar accumulation in EFNs, ants may induce continue production of nectar by host plants (Heil *et al.* 2000). On the other hand, herbivorized plants may increase nectar production to become more attractive to protecting ants (Pulice and Packer 2008, Lach *et al.* 2009, but see also Korndörfer and Del-Claro 2006).

Implications to the study of communities

Several authors have demonstrated that associations between ants and EFN-bearing plants can decrease foliar herbivory (Bentley 1976, Rutter and Rausher, 2004) and/or increase fruit set (Nascimento and Del-Claro 2010). However, some studies have shown that the positive effects of ants on ant-plant associations are not universal (see O'Dowd and Catchpole, 1983; Rashbrook *et al.*, 1992; Rosumek *et al.*, 2009). If the reciprocal is also true, and EF nectar does not represent a key resource to ants in any

circumstances (as predicted by Davidson 1998 and here proved to *C. pusillus*), is a matter of question. Although *C. pusillus* is one of many species that have been cited as providing benefits to plants (e.g. Korndörfer and Del-Claro 2006, Nascimento and Del-Claro 2010), several recent studies have demonstrated that in some cases this ant species may provide no plant protection (Sendoya *et al.* 2009), or may even act as a parasite of mutualism (Byk and Del-Claro 2010). Studies that investigated the strategies of parasite ants in ant-plant interactions showed that the cheater relies less on host-derived food resources than do the mutualists (Clement *et al.* 2008, Heil *et al.* 2009). In the present case, if *C. pusillus* may be considered a parasite as predicted by Byk and Del-Claro (2010), our data contradict the observations made by Clement *et al.* (2008) in myrmecophytic systems. Because *C. pusillus* strongly depends on EF nectar, we provide the first evidence that EF nectar is an important resource for an ant parasite of mutualisms.

Organisms interact not only directly but also indirectly, and indirect effects are important forces driving ecological communities (Ohgushi 2008) that can cause variation in the outcomes of interspecific relationships (Del-Claro and Oliveira 2000). Although few studies have directly investigated the effects of EF nectar on communities (Rosumek *et al.* 2009), current evidence suggests that EF nectar may influence species composition, abundance, and interactions at the community scale (Keeler 1978, Rico-Gray *et al.* 1998). Thus, the prevalence of EFN-bearing plants, reaching up to 30% in some regions (Rico-Gray and Oliveira 2007, Blüthgen *et al.* 2000), shows the potential of EF nectar to mediate species interactions beyond the simple tri-trophic food chain of plant-herbivores-enemies, (Rudgers and Gardner, 2004).

We know that the outcomes of interactions vary among populations in space and time (Bronstein 1998). Species in local populations are likely to experience different patterns of selection, with reciprocal selection between ants and plants, for example, occurring only in some locations (“Geographic mosaic theory of coevolution”; Thompson 2005). In this context the study of reciprocal benefits in ant-EFN bearing plants systems in multiple regions may be an important tool for testing differences among populations in traits shaped by coevolutionary processes, predictors of geographic structures coevolution (Thompson 2005). This knowledge will contribute to our understanding of how variation in the outcomes of multispecies interactions affects evolution of EF nectar traits. Knowing that EF nectar is an important resource for ants with measurable benefits is a basic step in this context.

In conclusion, our results have shed new light on the relationships between ants and EFN-bearing plants. The ant *C. pusillus* is the first case in which we have strong evidence that EF nectar may improve colony growth and development, corroborating more than 100 years of experimental evidence of benefits to plants in these widespread relationships.

5- REFERENCES

- Baker, H. G., P. A. Opler, & I. Baker. 1978.** A comparison of the amino acid complements of floral and extrafloral nectaries. *Botanical Gazette* **139**:322–332.
- Bentley, B. L. 1976.** Plants bearing extrafloral nectaries and the associated ant community: Interhabitat differences in the reduction of herbivore damage. *Ecology* **57**:815–20.
- Bhatkar, A. & W. H. Whitcomb. 1970.** Artificial diet for rearing various species of ants. *Fla. Entomology*. **53**: 217-232
- Blüthgen, N., M. Verhaagh, W. Goitia, K. Jaffe, W. Morawetz, & W. Barthlott. 2000.** How plants shape the ant community in the Amazonian rainforest canopy: the key role of extrafloral nectaries and homopteran honeydew. *Oecologia* **125**:229–240.
- Blüthgen N, Gottsberger G, & Fiedler K. 2004** Sugar and amino acid composition of ant-attended nectar and honeydew sources from an Australian rainforest. *Austral Ecol* **29**:418–429.
- Borer, E.T., E.W. Seabloom, J.B. Shurin, K.E. Anderson & C.A. Blanchette et al. 2005.** What determines the strength of a trophic cascade? *Ecology* **86**: 528–537.
- Bronstein, J.L. . 1998.** The contribution of ant-plant protection studies to our understanding of mutualism. *Biotropica* **30**:150–61.
- Clement, L.W., Köppen, S.C.W., Brand, W.A. & Heil, M. 2008.** Strategies of a parasite of the ant-*Acacia* mutualism. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **62**: 953-962.
- Cushman, J. H. & Beattie. A. 1991.** Mutualisms: Assessing the benefits to hosts and visitors. - *Trends Ecol. Evol.* **6**: 193-195.

- Cushman J.H., Rashbrook V.K., Beattie A.J. 1994.** Assessing benefits to both participants in a Lycaenid-ant association. *Ecology* 75:1031–1041.
- Dafni, A. 1992.** Pollination ecology: a practical approach (the practical approach series). New York, Oxford: University press. 250p
- Davidson D.W. 1998.** Resource discovery versus resource domination in ants: a functional mechanism for breaking the trade-off. *Ecol Entomol* 23:484–490.
- Davidson, D. W., Cook, S. C., Snelling, R. R. et al. 2003.** Explaining the abundance of ants in lowland tropical rainforest canopies. *Science* 300: 969- 972.
- Del-Claro, K. and Oliveira, P.S. 1999.** Ant-homoptera interactions in a Neotropical savanna: the honeydew-producing treehopper *Guayaquila xiphias* (Membracidae) and its associated ant fauna on *Didymopanax vinosum* (Araliaceae). *Biotropica*, 31(1): 135-144.
- Del-Claro, K. and Oliveira, P.S. 2000.** Conditional outcomes in a neotropical treehopper-ant association: temporal and species-specific variation in ant protection and homopteran fecundity. *Oecologia*.124 (2):156-165.
- Del-Claro, K. and Torezan-Silingardi, H.M. 2009.** Insect-plant interactions: New pathways to a better comprehension of ecological communities in Neotropical savanna. *Neotrop. Entomol.* 38, 159-164.
- Fiedler, K. and Saam, C. 1995.** Ants benefit from attending facultatively myrmecophilous Lycaenidae caterpillars: evidence from a survival study. *Oecologia* 104: 316-322.
- Fokuhl G, Heinze J, Poschlod P. 2007.** Colony growth in *Myrmica rubra* with supplementation of myrmecochorous seeds. *Ecol Res* 22:845–847.
- Gammals N, Bullock JM, Schonrogge K.2005.** Ant benefits in a seed dispersal mutualism. *Oecologia* 146:43–49.

- Heil M, Fiala B, Baumann B, Linsenmair KE 2000.** Temporal, spatial and biotic variations in extrafloral nectar secretion by *Macaranga tanarius*. *Funct Ecol* 14:749–757.
- Heil M., González-Teuber, M., Clement L.W., Kautz, S., Verhaagh, M. and Bueno, J.C.S. 2009.** Divergent investment strategies of *Acacia myrmecophytes* and the coexistence of mutualists and exploiters. *PNAS* 106(43)18091-18096.
- Irwin, H.S., Barneby, R. 1982.** The American Cassinae. A synoptical revision of Leguminosae tribe Cassieae subtribe Cassinae in The New World. *Mem. N. Y. Bot. Gard.* 35: 1-918.
- Janzen, D.H. 1975.** *Pseudomyrmex nigropilosa*: a parasite of a mutualism. *Science* 188 (4191):936-937.
- Kearns, C. A. & Inouye, D. 1993.** Techniques for pollinations biologists. Niwot, Colorado: University press of Colorado. 579p.
- Keeler, K. H. 1978.** Insects feeding at extrafloral nectarines of *Ipomoea carnea* (Convolvulaceae). *Entomological News* 89:163–168.
- Koptur S 1992.** Extrafloral nectary mediated interactions between insects and plants. In: Bernays E (ed) *Insect–plant interactions*. CRC Press, Boca Raton, pp 81–129
- Korndörfer, A.P. & Del-Claro, K. 2006.** Ant defense versus induced defense in *Lafoensia pacari* (Lythraceae), a myrmecophilous tree of the Brazilian cerrado. *Biotropica* 38(6): 786-788.
- Lach, L., Hobbs, E.R. & Majer, E. J. D. 2009.** Herbivory-induced extrafloral nectar increases native and invasive ant worker survival. *Popul. Ecol* 51: 237-243.
- Letorneau, D. K. 1990.** Code of ant-plant mutualism broken by parasite. *Science* 248:215-217.

- Mendonça, R.C., Felfili, J.M, Walter, B.M.T, Silva Júnior, M.C., Rezendi, A.V., Filgueiras, T.S., Silva, P.E.N. 1998.** Flora vascular do cerrado, In Sano, S.M., Almeida, S.P. (Eds.), Cerrado: ambiente e flora. Planaltina, DF, Brazil: EMBRAPA-CPAC. pp. 288-556
- Morales M.A., Heithaus ER 1998.** Food from seed-dispersal mutualism shifts sex ratios in colonies of the ant *Aphaenogaster rudis*. *Ecology* 79:734–739
- O’Dowd, D. J.; Catchpole, E. A. 1983.** Ants and extrafloral nectaries: no evidence for plant protection in *Helichrysum* ssp. – ant interactions. *Oecologia*, v. 59, n. 2, p. 191-200.
- Ohgushi, T. 2008.** Herbivore-induced indirect interaction webs on terrestrial plants: the importance of non-trophic, indirect, and facilitative interactions. *Entomol. Exp. Appl.* 128: 217-229.
- Polis, G. A., & K. O. Winemiller. 1996.** Food webs. Integration of patterns and dynamics. Chapman and Hall, New York, New York, 548p.
- Powell, S. 2008.** Ecological specialization and the evolution of a specialized caste in *Cephalotes* ants. *Functional Ecology* 22:902-911.
- Pulice, C.E. & Packer, A.A. 2008.** Simulated herbivory induces extrafloral nectar production in *Prunus avium*. *Functional Ecology* 22:801-807.
- Rashbrook, V. K., Compton, S. G. & Lawton, J. H. 1992.** Ant–herbivore interactions: reasons for the absence of benefits to a fern with foliar nectaries. *Ecology*, 73, 2167–2174.
- Rico-Gray, V. & P.S. Oliveira 2007.** The ecology and evolution of ant-plant interactions. The University of Chicago Press, Chicago.
- Rico-Gray, V., M. Palacios-Rios, J. G. Garcia-Franco, & W. P. Mackay. 1998.** Richness and seasonal variation of ant– plant associations mediated by plant-derived food resources in the semiarid Zapotitlan Valley, Mexico. *American Midland Naturalist* 140:21–26.

- Rosumek, F.B., Silveira, F.A.O., Neves, F.S., Barbosa, N.P., Diniz, L., Oki, Y., Pezzini, F., Fernandes, G.W., Cornelissen, T. 2009.** Ants on plants: a meta-analysis of the role of ants as plant biotic defenses. *Oecologia* 160, 537-549.
- Rutter, M.T., Rausher, M.D. 2004.** Natural selection on extrafloral nectar production in *Chamaecrista fasciculata*: the costs and benefits of a mutualism trait. *Evolution* 58, 2657-2668.
- Rudgers, J.A. & Gardner, M.C. 2004.** Extrafloral nectar as a resource mediating multispecies interactions. *Ecology*, 85(6), 2004, pp. 1495–1502
- Sendoya, S.F., Freitas, A.V.L., Oliveira, P.S. 2009.** Egg-laying butterflies distinguish predaceous ants by sight. *Amer. Nat.* 174, 134-140.
- Sachs, J.L., Simms E.L. 2006.** Pathways to mutualism breakdown. *Trends Ecol Evol* 21:585–592.
- Simberloff, D. 2006.** Invasional meltdown 6 years later: important phenomenon, unfortunate metaphor, or both? *Ecol Lett* 9:912–919.
- Thompson, J. N. 2005.** The Geographic Mosaic of Coevolution. University of Chicago Press, Chicago, IL, USA. 443p.
- Wheeler, D.E. 1994.** Ants as primary consumers: diet and abundance in the Formicidae. In: Hunt JH, Nelepa CA (eds) *Nourishment in ants: patterns in individuals and societies*. Westview Press,

CAPITULO II

Formigas *Cephalotes* coletoras de néctar e pólen não fornecem proteção contra herbivoria: uma nova experiência de manipulação para testar a capacidade de proteção de formigas

RESUMO

O comportamento da formiga e as limitações biológicas devem ser considerados antes que sejam feitas generalizações sobre a capacidade de defesa de formigas que interagem com plantas. Com essa interação, testamos a ação protetora de *Cephalotes pusilus* Klug em *Ouratea spectabilis* Engl. (Ochnaceae), uma planta comum no cerrado e portadora de nectários extraflorais. Foram realizados três tratamentos: controle (acesso livre de formigas); tratamento- *Cephalotes*- (acesso permitido apenas para *Cephalotes pusillus*) e sem acesso de formigas (livre de formigas). Não houve diferença nos níveis de herbivoria foliar entre ramos experimentais. Houve visitação por diferentes espécies de formigas para ramos controle, que produziram quantidades de frutos significativamente maiores, bem como de sementes, quando comparados aos ramos *Cephalotes* ou sem formigas. Assim, os resultados mostraram que uma investigação da história natural do sistema, características morfológicas da formiga, capacidades defensivas e de comportamento são necessários antes de um papel protetor ser inferido a cada espécie de formiga associada.

Palavras-chave: interação formiga-planta; cerrado; néctar extrafloral; mutualismo, comportamento, *Cephalotes*.

Nectar- and pollen-gathering *Cephalotes* ants provide no protection against herbivory: a new manipulative experiment to test ant protective capabilities

ABSTRACT

The behavior of the ant and the biological limitations should be considered before generalizations are made about the defense capability of ants that interact with plants. With this interaction, we tested the protective action of *Cephalotes pusillus* Klug in *Ouratea spectabilis* Engl. (Ochnaceae), a common plant in the cerrado and the bearer of extrafloral nectaries. Three treatments were performed: control (free ant access); *Cephalotes*-treatment (access permitted only to *Cephalotes pusillus*) and ant-free treatment (no ants). No difference was found in the levels of leaf herbivory among experimental stems. Visitation by different ant species to control stems translated into significantly greater fruit and seed production by this stem category than by ant-free and *Cephalotes*-treated stems. Thus, results showed that an investigation of system's natural history, ant's morphological traits, defensive and behavioural capabilities, are needed before a protective role is inferred to each associated ant species.

Keywords: interaction ant-plant, Brazilian Tropical Savannah, extrafloral néctar, mutualism, behaviour.

1- INTRODUCTION

Extrafloral nectaries (EFNs) are nectar-producing glands that are usually not involved with pollination, but instead attract ants and other arthropods in a wide range of plants from different habitats worldwide (Koptur 2005). Many authors have demonstrated that ant visitation to EFNs can benefit the host because the ants prey upon the herbivores and/or reduce their activity on foliage (Bentley 1977; Koptur 2005; Del-Claro et al. 1996; Rico-Gray and Oliveira 2007). However, the data concerning the effectiveness of this ant-plant mutualism are controversial. Studies in different ecosystems have failed to detect any benefit to EFN-bearing plants provided by the ants (O'Dowd and Catchpole 1983; Mody and Linsenmair 2004). Lack of protection can be explained by (i) difficulties to assess seasonal variation and long-term outcomes in the ant-plant-herbivore interaction (O'Dowd and Catchpole 1983), (ii) differences in ant-foraging behaviour among habitats (Inouye and Taylor 1979), (iii) variable susceptibility of distinct herbivore groups to ant predation (Ito and Higashi 1991), and (iv) differences in the deterring skills among species of visiting ants (Dejean et al. 2000).

Many ant species are listed as visitors to EFNs in the neotropics, mainly in the subfamilies Formicinae, Myrmicinae and Dolichoderinae (Davidson et al. 2003). Species in the genus *Cephalotes* (Myrmicinae, Cephalotini) are commonly reported at EFNs in the Brazilian cerrado savanna (Del-Claro et al. 1996; Korndörfer and Del-Claro 2006). However, the protective capabilities of *Cephalotes* ants against insect herbivores are questionable (Sendoya et al. 2009). These ants have small mandibles and feed primarily plant and insect exudates such as extrafloral nectar and hemipteran honeydew, fallen fruits, feces of birds, dead animal matter, and slow-moving prey (Del-Claro and Oliveira 1999, 1996; Davidson et al. 2003). Although some species such as *C. atratus* L. can behave aggressively towards other ants (Corn 1980), in general *Cephalotes* ants appear to be ineffective as herbivore deterrents on EFN-bearing plants (Sendoya et al. 2009).

Recent studies have suggested that the action of ants only benefits plants when particular ant species are attracted, and positive consequences resulting from their presence are not counterbalanced by their negative effects on other beneficial arthropods (Mody and Linsenmair 2004). However, studies directed to evaluate the influence of specific ant species in trophic interactions are rare. The issue of ant behaviour and biological limitations should be considered before generalizations about

ant defensive capabilities was explored here through a new experimental manipulation performed in nature. We tested the hypothesis that one specific ant, *Cephalotes pusillus* Klug, a common visitor of EFNs in cerrado savanna will have a positive effect on visited plants reducing leaf herbivore levels and increasing fruit and seed production. Thus we tested the direct effects of a specific ant on the outcomes of an ant-plant-herbivore relationship in natural conditions.

2 -METHODS

Field work was carried out between August and October 2007 in the cerrado reserve (640 ha) of the Clube de Caça e Pesca Itororó, Uberlândia, State of Minas Gerais, Brazil (18°59'S, 48°18'W). The vegetation is a cerrado *sensu stricto*, consisting of a dense scrub of shrubs and trees with a fair amount of herbaceous plants (see Oliveira and Marquis 2002). A rainy and hot season occurs from September to April and a dry and cold season from May to August (Réu and Del-Claro 2005).

The extrafloral nectary bearing plant *Ouratea spectabilis* Engl. (Ochnaceae), an abundant tree (2-5 m tall) in the study area, was used as model in the field study. The plant has EFNs on the stipules that attract many ant species, both day and night (Table 1; Fig 1). EFNs are active mainly on young leaves, which are produced all year round, but mostly during the dry/cold season. The leaf expansion phase delay 15-20 days and the extrafloral nectar in EFNs in this period contains 16.75% of sucrose (mean $\pm$ SD = 16.75 $\pm$ 7.8 % of sucrose; n = 10 plants; one gland sampled from each of 10 plants). The most common herbivores of *O. spectabilis* are two species of Lepidoptera (*Udranomia* sp.; Hesperidae), whose caterpillar attack young leaves and feed concealed in shelters. Floral buds are attacked by beetles, mainly *Anthonomus ourateae* (Coleoptera: Curculionidae). Reproductive structures (stigma and stamens) are attacked by *Frankliniella* sp. (Thysanoptera: Thripidae) and petals by *Anthonomus* sp.

In the first week of August we tagged eleven individuals of *O. spectabilis* in the same phenological state (young leaves, and inflorescence shoots), level of foliar herbivory (< 1%), height (~ 2.5m), and number of stems (seven). In each individual plant we selected three similar-sized stems and randomly assigned them as (1) control, (2) *Cephalotes* treatment, or (3) ant-free treatment. Control stems received no manipulation and had free access by ants and other arthropods that climbed onto the plant. *Cephalotes* treatment stems received a band of a sticky resin (Tanglefoot®) at the base of the stem, to isolate treatment from ant visitation. Then, a glass tube (20 cm long

– with 2 cm of water concealed by cotton in its bottom and covered with red cellophane paper) containing a colony of *Cephalotes pusillus* (1 queen, 30 minor workers, and 10 major workers) was attached to the stem with wire about 5 cm beyond the tanglefoot barrier. *C. pusillus* colonies nesting in dead trunks in the same area have similar number of individuals (1 queen, 27 ± 5 minor workers, and 8 ± 6 major workers; $N = 8$). The tube was placed on stem to protect the ant colony from direct sun, or rain. Ant colonies were collected in the study site and maintained in the laboratory for six months prior to this experiment. Ant-free treatment stems also received a band of sticky resin and a glass tube in the same manner as described for the *Cephalotes* treatment stems, but without an ant colony inside.

We monitored ant colonies, stems, and buds weekly in the field. For each category of experimental stem nine young leaves (3 near the basis, 3 in the middle, and 3 in the apex of the stem) were tagged on the first day of the experiment and checked for herbivory levels late in October. Measurements of herbivory rates on leaves were assessed by placing them on a transparent grid (divided into millimeters). An index of herbivory from each leaf was estimated as the proportion of points in the grid falling within damage and undamaged areas of the leaf blade. Thus, a mean herbivory index for each tree was calculated (e.g. Dirzo and Domingues 1995, Körndorfer and Del-Claro 2006). Additionally, the number of floral buds produced by each stem was counted in late August. Fruit and seed production by experimental stems were expressed as the proportion of fruits formed per buds produced, and as the proportion of seeds per fruits produced, respectively. Comparisons among treatments (mean of nine leaves per treatment per tree to estimate herbivory, and mean of buds, fruits and seeds produced on the 11 stems of each treatment) were performed with non parametric statistics (Friedman Anova test; Zar 1999), using Statistica 7.0.

3- RESULTS

Cephalotes pusillus uses extrafloral nectar of *O. spectabilis* without providing any significant service to the plant. On the other hand, diversity of ant visitors (27 species, Table 1) seems to improve plant fitness. Results showed no differences in floral bud production (ANOVA X^2 Sq. = 0.7272; df = 2; p = 0.69, Fig 2) between groups. However, visitation by different ant species to control stems translated into significantly greater fruit (ANOVA X^2 Sq. = 5.6364; df = 2; p = 0.05) and seed (ANOVA X^2 Sq. = 6.7273; df = 2; p = 0.03) production by this stem category than by ant-free and *Cephalotes*-treated stems (Fig 2).



Fig. 1 A worker of *Camponotus crassus* Mayr feeding on an extrafloral nectar of the tree *Oratea specatibilis* Engl. (Ochnaceae) in the Brazilian tropical savannah (Cerrado).

No difference was found in the levels of leaf herbivory (ANOVA Chi Sqr. = 2.3888; df = 2; p = 0.30) among experimental stems. In fact, the level of foliar loss was low in all groups (less than 6%; Fig 2). However, we never observed *C. pusillus* attacking or removing any herbivore from the plants. On the contrary, workers of *C. pusillus* remained mostly inside their nest tubes, gathering EFNs, or feeding on pollen. Ant foragers on flowers of *Cephalotes*-treated stems removed almost all pollen available during the time between floral anthesis (around 0600 a.m.) and noon. On control stems, we observed *Camponotus crassus* (N = 10 events), *C. rufipes* (N = 9), *C. rengerii* (N = 7), *Ectatomma permagnum* (N = 3) and *Pseudomyrmex gracilis* (N = 2) attacking and chasing herbivores on leaves (Coleoptera, Hemiptera, Orthoptera). The ants: *Ps. gracilis*, *Crematogaster victima*, and *Pheidole* sp. were commonly seen visiting flowers and preying on thrips (*Frankliniella* sp.; Thysanoptera: Thripidae).

These ant species, and *Pachycondyla obscuricornis* (N = 3), also disturbed *Anthonomus ourateae* on buds. The beetle usually flew away or jumped off the leaf when approached or attacked by ants. Although also visiting *O. spectabilis* flowers, these ants didn't feed on or remove pollen.

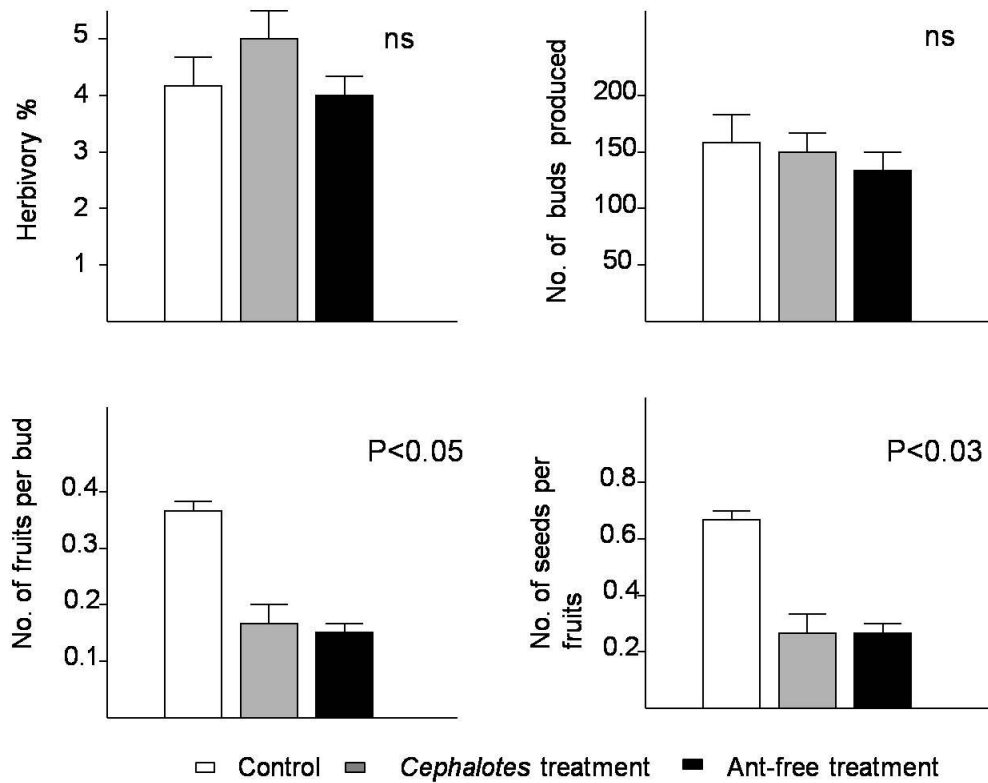


Fig. 2 Manipulative experimental tests on stems (control – stems with free ant access; *Cephalotes* treatment – stems only with *Cephalotes pusillus* ants; ant-free treatment – stems without ants) of the extrafloral nectar bearing plant *Ouratea spectabilis* (Ochnaceae; N = 11 trees) in the Cerrado vegetation. Data are means of: leaf herbivory, fruits per bud or seeds produced per fruits, of 11 stems of each treatment $\pm$ SE. Results showed no differences in foliar herbivory and floral bud production between groups. Control stems produced significant more fruits and seeds than the other ones. Analysis through Friedman ANOVA test.

Table 1 Ant species observed visiting extrafloral nectar glands on control stems of *Oratea spectabilis* (Ochnaceae) in a cerrado reserve in Uberlândia, Brazil. (D = diurnal species; N = nocturnal species).

Subfamily	Genera species	Main daily activity
Formicinae	<i>Brachymyrmex</i> sp.1	D
	<i>Camponotus</i> <i>atriceps</i> Fabricius, 1804	N
	<i>aff. blandus</i> Fr. Smith, 1858	D
	<i>crassus</i> Mayr, 1887	D
	<i>lespesii</i> Forel, 1886	D
	<i>leydigi</i> Forel, 1886	D
	<i>punctatus</i> Forel, 1886	D
	<i>renggeri</i> Emery, 1894	N
	<i>rufipes</i> Fabricius, 1775	D/N
	<i>sericeiventris</i> Guerin, 1838	D
	sp. 1	D
Ectatomminae	<i>Ectatomma</i> <i>opaciventre</i> Roger 1861	D
	<i>permagnum</i> Forel	D
	<i>tuberculatum</i> (Olivier)	D
Ponerinae	<i>Pachycondyla</i> <i>foedita</i> (Linnaeus)	N
	<i>obscuricornis</i> (Emery)	D
	<i>striata</i> Fr. Smith	D
	<i>villosa</i> (Fabricius)	D
Dolichoderinae	<i>Azteca</i> sp.1	D
Pseudomyrmecinae	<i>Pseudomyrmex</i> <i>gracilis</i> (Fabricius) 1804	D
Myrmicinae	<i>Cephalotes</i> <i>atratus</i> Linnaeus, 1758	D
	<i>clypeatus</i> Fabricius, 1804	N
	<i>pusillus</i> Klug, 1824	D
	<i>simillimus</i> (Kempf)	D
	<i>Crematogaster</i> <i>victima</i> (Smith)	D
	<i>Pheidole</i> sp.1	D
	<i>Solenopsis</i> sp.1	D

4- DISCUSSION

Variation in the effects of EFN-gathering ants on plants has been reported for various ant-plant systems (Bronstein 1998; Rico-Gray and Oliveira 2007 and references therein). Differences in capabilities among ant species (Dejean et al. 2000) to inhibit herbivore activity, is pointed out as a possible cause for these variable outcomes (Sendoya et al. 2009). Our study corroborates this view by showing that each species of the ant guild needs to be examined before included in a general context as plant-defender. The methodology we proposed, the use of artificial nests in natural conditions seems to be appropriated to test this type of question. Besides providing no benefit to the plants, pollen consumption by *C. pusillus* may reduce flower fertilization. Although commonly cited in the lists of plant visitors to EFNs and hemipteran honeydew (Del-Claro and Oliveira 2000) in cerrado, *C. pusillus* in fact is not a plant defender as recently showed by Sendoya et al. (2009), but instead seems to act as a parasite of ant-plant-herbivore systems in this savanna.

Compared with other studies, foliar herbivory level in *O. spectabilis* was low, less than 6% (Fig 2), even in undefended stems (see examples Rico-Gray and Oliveira 2007). Oliveira and Del-Claro (2005) showed that in cerrado vegetation leaf herbivory can surpass 50% in plants not visited by ants. Indeed, herbivores like thrips can completely destroy apical meristems in some plant species (e.g. Del-Claro et al. 1997, Oliveira and Del-Claro 2005). We believe that the reduced herbivory action on leaves, great differences can occur through time (examples in Oliveira and Marquis 2002), can have had major impact in the final analysis than the small sample size. On the other hand, some authors have already shown differences in ant capabilities against herbivores in cerrado. For example, *Camponotus rufipes*, *C. renggeri* and *C. crassus*, which attack herbivores on *O. spectabilis*, are also effective plant defenders in other ant-plant-herbivore systems (Del-Claro and Oliveira 2000). The outcomes of these ant-plant-herbivore interactions can also vary through time, depending on biotic and abiotic variations in the cerrado (Del-Claro and Oliveira 2000).

Diversity represents not only quantity of species in space and time, but also a progressive increase in different modes of life, including strategies used by predators to overcome prey defence mechanisms (Polis et al. 2000). We have also to consider that different herbivores attack different plant parts (Mothershead and Marquis 2000, Mody and Linsenmair 2004, Rosumeck et al. 2009), and different predators, as ant species, can also have different impact in distinct plant parts. Thus the diversity of deterring traits

exhibited by ant visitors should be considered when evaluating possible ant-derived benefits to plants bearing ant attractants.

Conditionality in the outcomes of mutualistic relationships appears to be a general rule (Bronstein 1998; Rosumeck et al. 2009). The ant-*Ouratea*-herbivore system shows that generalizations about ant-derived benefits to ant-visited plants are not possible without testing species-specific effects of ant visitors. Our findings support recent studies that have begun to place mutualisms in their community context. Mutualisms more often involve guilds of interacting species (Stanton 2003) and alternate partner species are often not equally effective, making partner identity an important source of variation in benefits (Fraser et al 2001; Mody and Linsenmair 2004; Bronstein et al 2006; Miller 2007 and references therein).

Cephalotes pusillus are morphologically limited to act as effective predators. They do not present a mouth adapted to grab, bit or cut animal prey efficiently. In the Costa Rican rain forest, due to their liquid diet, some *Cephalotes* species are also suggested to be more parasitic than mutualistic associates in an ant-hemipteran-plant system (Tillberg 2004). Additionally, the use of pollen by *C. pusillus* as food can negatively affect pollination. When ants enter flowers in the course of their activities they can reduce pollen viability and/or deter pollinator visits (Mothershead and Marquis 2000, Ness 2006).

Extrafloral nectar represents key for arboreal ant species (Davidson et al 2003) and is more predictable than prey, with strong bottom-up effects on the ant community structure (Bluthgen et al 2004). However, most nectar feeding ants are at least partly carnivorous (Holldobler and Wilson 1990). Considering that herbivores are not abundant in the cerrado savanna, but enormously diversified (Price et al 1995) this reveals the importance of diversity in plant defences against herbivory in this system, including diversity of hunt strategies in the associated ant defenders.

Stems open to ant visitation potentially received at least 27 different ant species (Tabel 1), with the predominance of eight species, foraging day and night for nectar and animal prey on leaves, buds and flowers. Some of the common ants had clear beneficial impact in control stems, like *Pachycondyla obscuricornis* that visits flowers and preys on herbivores without removing pollen or altering floral characteristics. Another example is *C. renggeri*, a very aggressive nocturnal ant. The cerrado is a hot and dry ecosystem during daylight hours, thus many herbivores display strong nocturnal activity. At this time *C. pusillus* is resting but *Camponotus renggeri* is active, complementing the services of diurnal ants. Co-occurrence, diversity and specialization

are common processes in ant-plant associations, with great impact in the whole community due to its vertical and horizontal effects in the trophic chains (Davidson and McKey 1993; Bluthgen et al 2004; Miller 2007).

Our utilization of this new type of manipulation (ant nest addition) demonstrates that each ant visitor species should be investigated in an individual way to elucidate its real potential as plant defender. A close investigation of the natural history of the system, including the ants morphological traits and defensive capabilities, are needed before a protective role is inferred. Therefore, local ant diversity should be considered as an important parameter suggesting positive effects in a general context of ant-plant-herbivore system. Some authors have discussed that for plants that secrete extrafloral nectar (EFN), visitation by multiple ant species that vary in anti-herbivore abilities may result in reduced benefits relative to an exclusive association with a high-quality mutualist (Stanton 2003; Miller 2007).

4- LITERATURE CITED

- Bentley BL (1977). Extrafloral nectaries and protection by pugnacious bodyguards. *Annual Review Ecology Systematics* 8: 407–427
- Bronstein JL (1998). The contribution of ant plant protection studies to our understanding of mutualism. *Biotropica* 30: 150-161
- Bronstein JL, Alarcon R & Geber M (2006). The evolution of plants-insect mutualisms. *New Phytologist* 172:412-428
- Bluthgen N, Stork NE & Fiedler K (2004). Bottom-up control and co-occurrence in complex communities: honeydew and nectar determine a rainforest ant mosaic. *Oikos* 106: 344-358
- Corn ML (1980). Polymorphism and polyethism in the Neotropical ant *Cephalotes atratus* (L.). *Insectes Sociaux* 27 (1): 29-42
- Davidson DW & MCKey D (1993). The evolutionary ecology of symbiotic ant-plant relationships. *Journal Hymenoptera Research* 2: 13-83
- Davidson DW, Cook SC, Snelling RR & Chua TH (2003). Explaining the abundance of ants in lowland tropical rainforest canopies. *Science* 300: 969–972
- Dejean A, Gibernau M & Durand JL (2000). Pioneer plant protection against herbivory: impact of different ant species (Hymenoptera: Formicidae) on a proliferation of the variegated locust. *Sociobiology* 36: 227-236
- Del-Claro K (2004). Multitrophic relationships, conditional mutualisms, and the study of interaction biodiversity in tropical savannas. *Neotropical Entomology* 33: 665-672
- Del-Claro K, Marullo R & Mound L A (1997). New Brazilian species of *Heterothrips* (Insecta; Thysanoptera). Interacting with ants in *Peixotoa tomentosa* flowers (Malpighiaceae). *Journal of Natural History* 31:1307-1312.
- Del-Claro K & Oliveira PS (1996). Honeydew flicking by treehoppers provides cues to potential tending ants. *Animal Behavior* 51:1071-1075
- Del-Claro K & Oliveira PS (1999). Ant-homoptera interactions in neotropical savanna: The honeydewproducing treehopper *Guayaquila xiphias* (Membracidae) and its associated ant fauna on *Didymopanax vinosum* (Araliaceae). *Biotropica* 31:135-144
- Del-Claro K & Oliveira PS (2000). Conditional outcomes in a neotropical treehopper-ant association: temporal and species-specific effects. *Oecologia* 124: 156-165

- Del-Claro K, Berto V & Réu W (1996). Herbivore deterrence by visiting ants increases fruit-set in an extrafloral nectary plant *Qualea multiflora* (Vochysiaceae) in cerrado vegetation. *Journal of Tropical Ecology* 12: 887-892
- Del-Claro K, Santos JC & Junior-Durães AS (2002). Etograma da formiga arborícola *Cephalotes pusilus* (Klug, 1824) (Formicidae: Myrmicinae). *Revista de Etologia* 4: 31-40
- Dirzo R & Dominguez CA (1995). Plant-herbivore interactions in Mesoamerican tropical dry forests. In Bullock SH, Medina E, Mooney HA (eds) *Seasonal tropical dry forests*. Blackwell, Oxford, UK, pp 169-186
- Fraser AM, Axe'n AH, Pierce NE (2001). Assessing the quality of different ant species as partners of a myrmecophilous butterfly. *Oecologia* 129: 452-460
- Holldobler B & Wilson EO (1990). *The ants*. Harvard Univ Press
- Inouye DW & Taylor OR (1979). A temperate region plant-ant-seed predator system: consequences of extrafloral nectar secretion by *Helianthella quinquenervis*. *Ecology* 60:1-7
- Ito F & Higashi S (1991). Variance of ant effects on the different life forms of moth caterpillars. *Journal of Animal Ecology* 60:327-334
- Koptur S, (2005). Nectar as fuel for plant protectors. In: Wäckers FL, van-Rijn PCJ, Bruin J (eds). *Plant-provided food for carnivorous insects: a protective mutualism and its applications*. Cambridge University Press, Cambridge, UK pp 75-108
- Korndörfer AP & Del-Claro K, (2006). Ant defense versus induced defense in *Lafoensia pacari* (Lythraceae), a myrmecophilous tree of the Brazilian cerrado. *Biotropica* 38(6):786-788
- Miller T E X (2007). Does having multiple partners weaken the benefits of facultative mutualism? A test with cacti and cactus-tending ants. *Oikos* 116:500-512
- Mothershead K & Marquis RJ (2000). Fitness impacts of herbivory through indirect effects on plant-pollinator interactions in *Oenothera macrocarpa*. *Ecology* 81:30-40
- Mody K & Linsenmair KE (2004). Plant-attracted ants affect arthropod community structure but not necessarily herbivory. *Ecological Entomology* 29:217-225.
- Ness JH (2006). A mutualism's indirect costs: the most aggressive plant bodyguards also deter pollinators. *Oikos* 113: 506-514
- O'Dowd DJ & Catchpole EA (1983). Ants and extrafloral nectaries: no evidence for plant protection in *Helichryum* spp.-ant interactions. *Oecologia* 59: 191-200

- Oliveira PS & Del-Claro K (2005). Multitrophic interactions in a Neotropical savanna: ant-hemipteran systems, associated insect herbivores, and a host plant. In: Burslem DFRP, Pinard, MA, Hartley SE eds, Biotic Interactions in the Tropics, Cambridge University Press, p. 414-438.
- Oliveira PS & Marquis RJ (2002). The Cerrados of Brazil. Ecology and Natural History of a Tropical Savanna. Columbia University Press, New York, USA
- Polis GA, Sears ALW, Huxel GR, Strong DR & Maron J (2000). When is a trophic cascade a trophic cascade? Trends in Ecology and Evolution 15:473-475
- Price PW, Diniz IR, Morais HC & Marques ESA (1995). The abundance of insect herbivore species in the tropics: High local richness of rare species. Biotropica 27: 468-478
- Réu WF, Del-Claro K (2005). Natural history and biology of *Chlamisus minax* Lacordaire (Chrysomelidae: Chlamisinae). Neotropical Entomology 34:357-362
- Rico-Gray V, Oliveira PS (2007). The ecology and evolution of ant-plant interactions. The University of Chicago Press, Chicago, USA
- Rosumek FB, Silveira, FAO, Neves FS, Barbosa NP, Diniz I, Oki Y, Pezzini F, Fernandes GW, Cornelissen T (2009). Ants on plants: a meta-analysis of the role of ants as plant biotic defenses. Oecologia 160, 537-549
- Sendoya SF, Freitas AVL & Oliveira PS (2009). Egg-laying butterflies distinguish predaceous ants by sight. Amer. Nat. 174, 134-140
- Stanton ML (2003). Interacting guilds: moving beyond the pairwise perspective on mutualisms. Amer. Nat. 162, 10-23
- Tillberg CV (2004). Friend or foe? A behavioral and stable isotopic investigation of an ant-plant symbiosis. Oecologia 140:506-515

CAPITULO III

ECOLOGIA DA INTERAÇÃO ENTRE FORMIGAS, HERBÍVOROS E *OURATEA SPECTABILIS* ENGL. (OCHNACEAE): UM TESTE SOBRE A TEORIA DO MOSAICO GEOGRÁFICO DE THOMPSON

RESUMO

As associações com formigas, atraídas por nectários extraflorais (NEFs), são provavelmente as principais defesas bióticas dos vegetais. O presente estudo tem como objetivo avaliar a variação, ao longo do tempo, dos benefícios conferidos pelas formigas visitantes de NEFs de *Ouratea spectabilis* (Ochnaceae) no ambiente Cerrado, contra a ação de herbívoros. As principais questões investigadas foram: (a) Os benefícios dessa interação se restringem à herbivoria foliar? Ou há repercussão sobre o valor adaptativo das plantas? (b) Os resultados das interações são condicionais? Dependem da variação sazonal? O quanto conservativas essas interações são em função da variação temporal e geográfica? Os dados foram coletados entre 2006 e 2008 em Uberlândia – MG, Água Clara – MS e Brasília – DF, simultaneamente, a partir de dados sobre herbivoria foliar, floral e formigas associadas. Os resultados tiveram o mesmo significado (proteção a folhas, frutos e sementes), independente da variação geográfica. Encontramos mudanças nas características geográficas, ambientais, em algumas espécies visitantes (formigas e herbívoros), incluindo o comportamento, porém, os resultados ecológicos são os mesmos. Isso sugere que se um tipo de interação é resultado de coevolução, o conjunto de elementos interagentes está sujeito a pressões seletivas semelhantes que conduzirão a interação para um mesmo resultado, neste caso uma relação mutualística, que permanece por longos períodos de tempo, corroborando a Teoria dos Mosaicos Geográficos de Coevolução.

Palavras-chave: mosaicos geográficos, coevolução, mutualismo, formigas, interação, Teoria de Thompson

**ECOLOGY OF THE INTERACTION BETWEEN ANTS, HERBIVORES AND
OURATEA SPECTABILIS ENGL. (OCHNACEAE): A TEST ON THE THEORY OF
GEOGRAPHIC MOSAIC OF THOMPSON**

ABSTRACT

The associations with ants, attracted by extrafloral nectaries (EFN), are probably the main biotic defenses of plants. This study aims to evaluate the change over time, the benefits conferred by the ant EFN visitors from *Ouratea spectabilis* (Ochnaceae) in the Brazilian savannah, against the action of herbivores. The main issues investigated were: (a) The benefits of this interaction is restricted to leaf herbivory? Or is there impact on the adaptive value of plants? (b) the results of interactions are conditional? Depend on the seasonal variation? how conservative these interactions are a function of temporal and geographical variation. Data were collected between 2006 to 2008 in Uberlândia - MG, Água Clara - MS and Brasília - DF, while collecting data on leaf herbivory, floral and associated ants. The results have the same meaning (protection of leaves, fruits and seeds), regardless of geographic variation. Found changes in the geographical, environmental, in some species visitors (ants and herbivores), including behaviour, however, the ecological results are the same. This suggests a kind of interaction is the result of coevolution, the set of interacting elements are subject to similar selective pressures that lead to interaction for the same outcome in this case a mutualistic relationship, which remains for long periods of time, supporting the theory of Geographical Mosaics of Coevolution.

Keywords: geographical mosaics, coevolution, mutualism, ants, Interaction, Theory Thompson

1- INTRODUÇÃO

Com relação às interações entre animais e plantas, os biólogos, há muito tempo, têm priorizado estudos relativos à polinização; talvez porque as adaptações envolvidas sejam evidentes, chamativas e, em muitos casos, tenham interesse comercial. Por outro lado, a atenção dispensada a uma outra grande parte das interações entre animais e plantas, a herbivoria, foi relativamente pequena até meados dos anos de 1970 (EDWARDS & WRATTEN, 1981). Entretanto, atualmente tem-se aumentado as pesquisas nas fascinantes relações entre plantas e herbívoros que possibilitam um melhor entendimento de relações mutualísticas e do processo coevolutivo (e.g. DEL-CLARO & TOREZAN-SILINGARDI 2009).

Grande parte da energia necessária à sobrevivência dos seres vivos depende da energia captada pelas plantas. Muitos aminoácidos, vitaminas e minerais são obtidos apenas por organismos fotossintetizantes (RICKLEFS, 2003). Assim, as adaptações bióticas e estruturais dos produtores beneficiam outros organismos, sendo que a reciclagem de elementos químicos e a de energia através dos níveis tróficos envolvem uma complexa série de eventos, na qual a sequência de cada grupo envolvido tem um papel definido (RAVEN, 2001; PRICE 2002; RICKLEFS, 2003). Plantas terrestres, principalmente as lenhosas, alojam boa parte da sua produção em estruturas de difícil ingestão e metabolismo pelos consumidores primários (CRAWLEY, 1983). Embora os herbívoros apresentem adaptações especializadas em extrair esta energia, a eficiência de assimilação é baixa, havendo considerável perda através de material fecal ou não utilizado (BEGON, 1990).

As plantas possuem várias estratégias de defesa em resposta à ação de herbívoros, dentre as quais, defesas químicas, no caso da presença de alcalóides, taninos e outras substâncias; defesas físicas, como presença de espinhos, tricomas, acúmulo de silício, dureza foliar; defesas fenológicas ou desenvolvimentais, como a floração ou crescimento vegetativo em período de baixa densidade nas populações de insetos herbívoros (MARQUIS & BRAKER, 1994; ABDALA-ROBERTS & PARRA-TABLA, 2005). E também defesas bióticas, como a associação com animais, principalmente formigas (JANZEN, 1966; KEELER, 1989; KOPTUR, 1992; CUAUTLE & RICO-GRAY 2003; DEL-CLARO, 2004). Essas defesas, geralmente aumentam o valor adaptativo das plantas (EHRlich & RAVEN, 1964, KOPTUR 1992), mas há exceções (e.g. RASHBROOK *et al.* 1992). O néctar extrafloral é o tipo de alimento mais comumente oferecido às formigas

por plantas, beneficiando vários táxons como Myrmicinae, Formicinae e Dolichoderinae (OLIVEIRA & BRANDÃO, 1991; DAVIDSON, *et al.*, 2004). As formigas visitantes dos NEFs geralmente são carnívoras e assim podem proteger as plantas de herbívoros, predando ou inibindo a ação desses insetos (BENTLEY, 1977; HORVITZ & SCHEMSKE, 1984; KOPTUR, 1984; DEL-CLARO *et al.*, 1996; FUENTE & MARQUIS, 1999; OLIVEIRA & DEL-CLARO, 2005). Assim sendo, o papel dos NEFs contra a herbivoria ainda é um assunto que envolve grandes discussões e que os resultados dessas relações parecem ser sempre condicionais (Bronstein, 1998).

Ao que parece, relações mutualísticas, tais como aquelas entre formigas e plantas possuidoras de NEFs, são exemplos de coevolução (BRONSTEIN 2009). Coevolução entre espécies, ou grupos de espécies, pode gerar grande conservacionismo filogeográfico e filogenético nessas associações, onde populações irão diferir nas características moldadas por uma interação e estas características das espécies interagentes irão ser bem ajustadas em algumas comunidades e mal ajustadas em outras (THOMPSON, 2005). Recentemente, Thompson publicou a Teoria dos Mosaicos Geográficos da Coevolução (THOMPSON, 2005), onde apresenta sua hipótese, que se baseia nas premissas: 1- As espécies são grupos de populações geneticamente diferenciadas, e a maioria das espécies que interage não apresenta variações geográficas; 2- As espécies são filogeneticamente conservativas em suas interações, e este conservacionismo geralmente traz relações interespecíficas por longos períodos de tempo; 3- A maioria das populações locais especializa suas interações sobre outras poucas espécies; 4- As consequências ecológicas destas interações interespecíficas diferem entre as comunidades; 5- As espécies geralmente se tornam adaptadas a populações locais de outras espécies e continuam a evoluir rapidamente. Com base nas premissas anteriores, THOMPSON (2005) apresenta três previsões gerais da Teoria dos Mosaicos Geográficos da Coevolução, que: 1- “Populações irão diferir nas características moldadas por uma interação; 2- As características das espécies interagentes irão ser bem ajustadas em algumas comunidades e mal ajustadas em outras; 3- Haverá poucas espécies coevoluindo, porque poucas características irão ser globalmente favorecidas”. Embora seja uma teoria de grande importância para a compreensão das relações de coevolução em sistemas plantas-formigas e herbívoros, essa teoria ainda não foi testada nesse sentido (DEL-CLARO & TOREZAN-SILINGARDI, 2009).

OLIVEIRA & OLIVEIRA-FILHO (1991), mostraram que plantas que possuem NEFs podem representar mais de 31% dos indivíduos e 25% das espécies da flora arbórea dos cerrados do Brasil). Embora o Cerrado seja um bioma bem definido, ocupando 25% do território brasileiro, relativamente poucos estudos têm examinado as relações entre plantas e insetos nesse bioma. Aproximadamente, 30% de todos os estudos feitos neste bioma têm interesse na exploração agrícola do solo ou no extrativismo (OLIVEIRA & MARQUIS, 2002). OLIVEIRA *et al.* (1987) foram os primeiros a estudar plantas com NEFs no Cerrado. COSTA *et al.* (1992) e DEL-CLARO *et al.* (1996) demonstraram que formigas diminuem significativamente a herbivoria foliar e de botões florais. Revisões recentes (OLIVEIRA *et al.*, 2002; OLIVEIRA & FREITAS, 2004; OLIVEIRA & DEL-CLARO, 2005) têm rediscutido esses estudos oferecendo novas informações, indicando que plantas com NEFs no Cerrado podem servir como excelente material para os estudos investigativos sobre o conservacionismo filogeográfico e filogenético nas relações mutualísticas, como proposto por THOMPSON (2005).

Ouratea spectabilis Engl. (Ochnaceae) é uma planta de porte arbóreo, comum em várias fisionomias de Cerrado, tendo sua floração entre agosto e novembro (LORENZI, 2002). Suas folhas não apresentam sincronia na brotação e são frequentemente alvos de herbívoros. Pelo fato de possuir NEFs ativos nas estípulas dos ramos jovens, atraem comumente formigas diurnas e noturnas. Por essas características *O. spectabilis* torna-se um objeto de investigação atraente para testar a Teoria dos Mosaicos da Coevolução (TMC), pois apresenta ampla distribuição, ocorrendo do Mato Grosso do Sul ao Planalto Central, tamanho acessível (2 a 7 metros de altura) e recursos (moradia e alimento) para formigas e herbívoros, inclusive já demonstrados em outros estudos (BYK, 2006). Com isso, o presente estudo se propõe a avaliar as premissas da TMC, tendo como modelo uma relação formiga-planta com NEFs, testando as seguintes hipóteses: 1- há condicionalidade, dependente de variação sazonal (ao longo do tempo), espacial (ao longo do gradiente ambiental) e de fatores bióticos (como espécies de formigas e herbívoros), nas interações observadas entre *O. spectabilis*-herbívoros-formigas no Cerrado; 2- há conservacionismo filogeográfico no resultado das interações *O. spectabilis*-herbívoros-formigas, conforme sugerido por THOMPSON (2005).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ÁREA DE ESTUDO

O presente estudo foi desenvolvido em três áreas simultaneamente (Figura 1), entre outubro de 2006 a fevereiro de 2008. Nestas áreas onde *Ouratea spectabilis* (Ochnaceae) é uma planta freqüente, com altura variando entre 2-5 m.

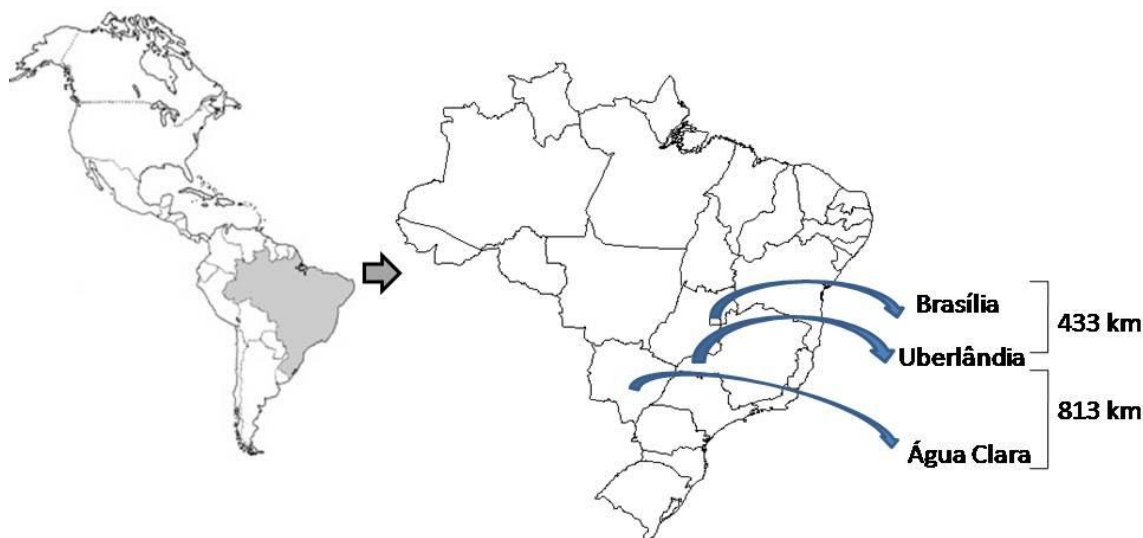


Figura 1. Localização geográfica dos pontos de coletas: Brasília – Distrito Federal; Uberlândia – Minas Gerais e Água Clara- Mato Grosso do Sul.

A primeira área foi a reserva do Clube de Caça e Pesca Itororó de Uberlândia (CCPIU), em Uberlândia – Minas Gerais (18°59'S, 48°18'O) (Figura 2 A e B). Essa área é coberta por vegetação de cerrado *sensu stricto* (ARAÚJO, 2002) e apresenta 863 metros de altitude. A segunda área foi delimitada entre os municípios de Água Clara e Ribas do Rio Pardo – Mato Grosso do Sul (15°33'S, 56°03'O) (Figura 2 C e D) localizadas aproximadamente a 120 km de Campo Grande, a 303 metros de altitude. Já a terceira área foi na fazenda Água Limpa (FAL) – DF (15°56' S e 47°46' W), pertencente à Universidade de Brasília (UNB) e nos fundos do Aeroporto de Brasília (15 °56'- 15 ° 59' S e 47 ° 55'-47 ° 58' W) (Figura 2 E e F). A região tem altitude de 1100 m. As áreas possuíam fisionomias de cerrado *sensu stricto* semelhantes (GOODLAND & FERRI, 1979).

2.2- Mensuração da herbivoria foliar

Em cada área, no mês de reprodução de *O. spectabilis* (outubro), 30 indivíduos com aproximadamente três metros de altura, em início de floração, foram marcados. Cada planta foi dividida em duas partes: a - ramos controle, onde o acesso de formigas foi mantido naturalmente; b - ramos tratamento, onde o acesso de formigas foi impedido por meio da aplicação de uma resina atóxica (Tanglefoot®) na base do galho. Antes desta, o excesso de súber foi retirado, passado fita crepe e acima desta a resina mencionada. Qualquer outro meio que pudesse servir de acesso às formigas nos ramos tratamento foi removido.

A unidade amostral foi “ramos de uma mesma planta”. Nos ramos Tratamento e Controle, nove folhas de cada ramo (três mais distais, as três medianas e três mais basais) tiveram a herbivoria avaliada, sem a sua remoção. Isso ocorreu no primeiro dia do experimento e posteriormente a cada 30 dias. A análise de herbivoria seguiu o método de comparação da área foliar perdida versus a área total. Houve uma defasagem de cinco a oito dias na amostragem entre as áreas, em virtude do tempo gasto para a montagem e o deslocamento entre áreas.



Figura 2. A e B) Vista geral da área de estudo em Uberlândia - MG; C) indivíduo experimental de *Ouratea spectabilis*, D) vista parcial da área de estudo em Água Clara - MS; E e F) Vista da área de estudo em Brasília – DF.

2.3 - Herbivoria floral (ou Impacto Reprodutivo)

O período de floração ocorreu de agosto a dezembro nas três áreas, com o ‘boom’ de florada entre outubro e novembro. Cada planta marcada teve inflorescências nos ramos tratamento e controle. No primeiro dia do experimento, foram contados e marcados todos os botões florais. Após um período de aproximadamente 60 dias, era

possível contabilizar o número de frutos e em torno de 75 dias mais tarde, as sementes formadas em cada grupo.

2.4 - Identificação de formigas associadas

Em cada área, foram feitas visitas mensais diurnas e noturnas, a fim de se coletar exemplares das espécies de formigas visitantes das plantas marcadas. As coletas foram manuais e tinham duração de 25 minutos. O material testemunho será depositado em breve na coleção do Museu de Biodiversidade do Cerrado.

2.5 - Identificação de insetos herbívoros

Inicialmente, empregou-se a coleta manual ativa para a captura de insetos herbívoros. No caso de predadores de botões, foram utilizados sacos de organza para impedir a sua evasão até completarem seu ciclo de desenvolvimento. Após a coleta, os animais foram criados em condição de laboratório (Figura 3) até completarem o ciclo, e, posteriormente, colocados em álcool 70 GL ou congelados, para serem identificados mais tarde. Esta coleta se deu em indivíduos não experimentais, a fim de não interferir na pressão dos herbívoros sobre as plantas.

Para lagartas em período de desenvolvimento, foi necessária sua coleta em campo e posterior criação em laboratório. Para tanto, foi desenvolvido a Câmara de criação (Figura 3). Esta câmara é composta por três partes de acrílico. No primeiro compartimento é adicionado água (20 ml). Sobre esta é adicionado o segundo compartimento que se encaixa sobre o primeiro. No seu fundo, há oito buracos pequenos (1,5 mm) para que o vapor d'água suba para este, bem como um filete de algodão ligando um destes buracos até o primeiro compartimento. Dentro desse compartimento são adicionadas folhas jovens e as lagartas. Após, é adicionado um terceiro compartimento, em forma de funil, o qual se encaixa sobre o segundo compartimento. Dessa forma, as folhas demoram em média cinco dias a desidratar,— em outros métodos estariam murchas no final do primeiro dia. Não há contaminação por fungos e os detritos acabam no fundo, facilitando a limpeza. Após a eclosão, os indivíduos não têm onde se fixarem e obrigam-se a voar. Naturalmente procuram a área mais alta do pote e acabam voando ao redor do funil, facilitando a observação do pesquisador.

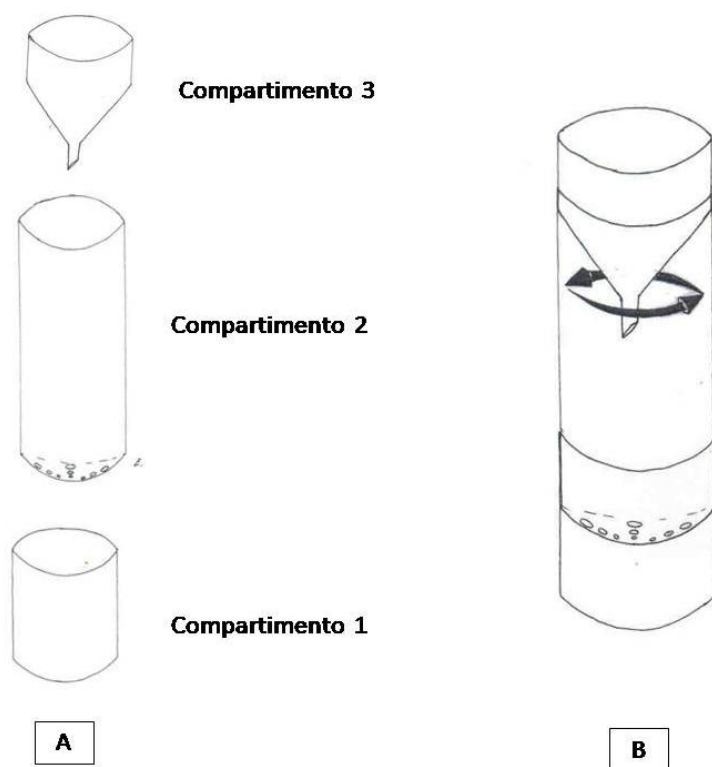


Figura 3. Câmara para desenvolvimento de larvas de insetos herbívoros. A) Os três compartimentos apresentados separadamente e em seqüência, onde no compartimento 1 é colocado água. No compartimento 2 é colocado as folhas juntamente com as larvas e vapor da água vindo do compartimento 1 umidece esta. O compartimento 3 evita a fuga de indivíduo adulto e permite que o ar circule pelo orifício em forma de funil; B) A câmara já montada. As setas ao centro indicam o direcionamento do vôo de indivíduos recém eclodidos.

2. RESULTADOS

O período de estudo foi marcado por chuvas em todos os meses para a área de Água Clara (Figura 1 B). Para Uberlândia e Brasília, houve um período de seca na área de estudo (Figura 4 A e C).

A Temperatura foi diferente nas áreas. Em Uberlândia e Brasília, a oscilação foi menor, apresentando uma média anual de 23,3 e 21, 7°C (Figura 4 A e C). Já em Água Clara, a média anual foi de 29,6°C e a oscilação foi maior, onde em alguns meses do inverno, a máxima não atingiu 18°C, inclusive com ocorrência de geada no mês de junho de 2007 (Figura 4 B).

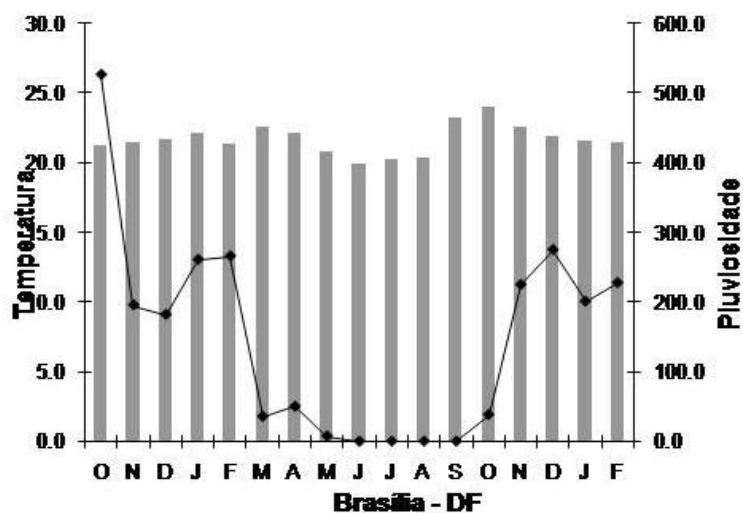
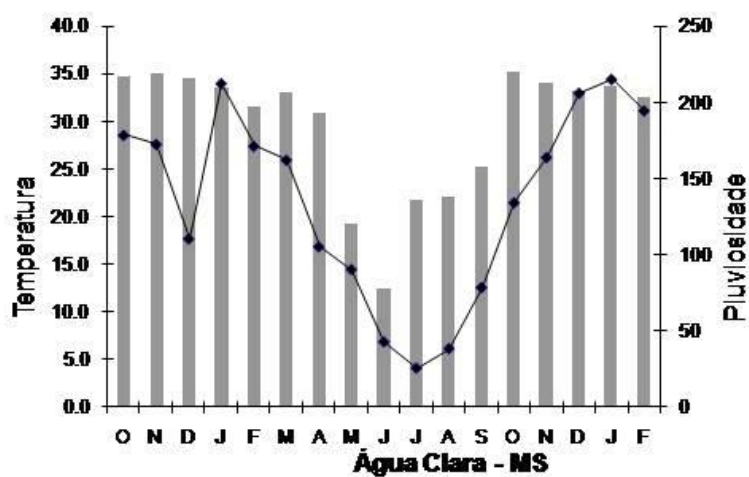
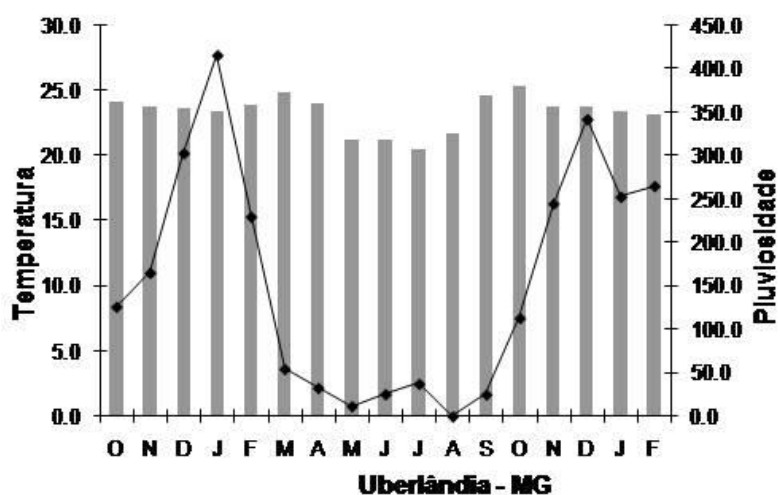


Figura 4. Dados climatológicos (temperatura e pluviosidade) nas três áreas de coleta entre outubro de 2006 à fevereiro de 2008 (médias mensais). Barras indicam temperatura (° C) e colunas a pluviosidade (mm). Fonte: Estação climatológica da UFU para dados de Uberlândia – MG; Grupo Guerdao para dados de Água Clara – MS e INMET para dados de Brasília – DF.

Foram identificadas formigas pertencentes a cinco subfamílias e 11 gêneros, sendo que 33 espécies para a área de Minas Gerais, 30 para Mato Grosso do Sul e 34 no Distrito Federal. Estas espécies forragearam em NEFs de *O. spectabilis* durante o estudo (Tabela 1). O gênero *Camponotus* foi o mais comum em todas as áreas, embora *Crematogaster* tenha sido mais comum no MS do que nas outras regiões e a sobreposição de espécies tenha sido maior entre MG e DF do que entre estas áreas e MS. Cinco espécies, além de forragearem nos NEFs, também nidificaram na própria planta nas três áreas, sendo *Cephalotes pusillus*, *Pachycondyla villosa*, *Pseudomyrmex gracilis*, *Crematogaster victima* e *Crematogaster* sp.1. Esta última utilizou envoltórios foliares das lagartas presentes na planta como local de nidificação (Figura 5 A), sendo que as operárias e soldados matavam as lagartas e ocupavam o abrigo (Figura 5 B), que teve duração média de 14 meses. Estes envoltórios ficavam nas extremidades dos ramos, o que agilizava o acesso aos NEFs (Figura 5 C).

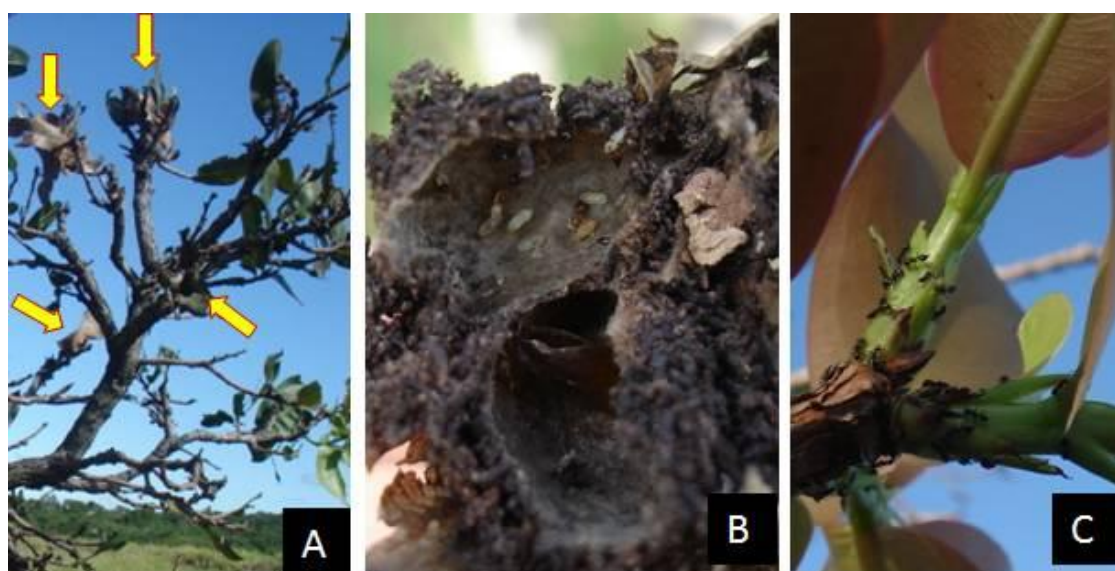


Figura 5. A) envoltórios de Lepidoptera encontrados em *Ouratea spectabilis*; B) envoltório ocupado por *Crematogaster* sp.; C) *Crematogaster* sp. alimentando-se de NEF em ramo experimental na região de Água Clara - MS.

Nos plantas experimentais de Brasília e Uberlândia foram encontrados ninhos em galhos, troncos e principalmente no súber, onde a espessura é suficiente para abrigar tais ninhos. Já na outra área, foram encontrados ninhos somente nos envoltórios e tronco. A diferença na espessura do súber entre áreas é facilmente notável (Figura 6).

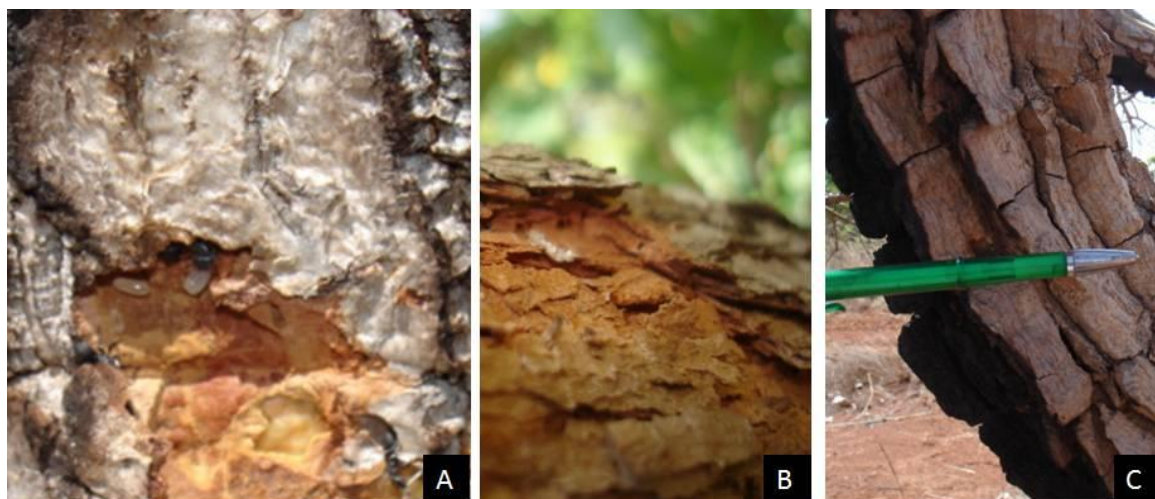


Figura 6. A) ninho de *Cephalotes pusilus* no súber de *Ouratea spectabilis* em Uberlândia - MG; B) espessura do súber em plantas de Água Clara - MS; C) espessura de súber em plantas experimentais de Brasília – DF.

Nas três áreas de estudo as formigas se alimentavam de NEF e exsudato de hemípteros, presentes principalmente no período de reprodução da planta que ocorreu de agosto a fevereiro. Podem preda, também, outros artrópodes presentes na planta, além de associações com lagartas de Lycaenidae, principalmente para Uberlândia e Brasília.

Tabela 1. Espécies de formigas encontradas em indivíduos experimentais de *Ouratea spectabilis* (Ochnaceae) entre outubro de 2006 à fevereiro de 2008. Para áreas: I) Uberlândia – MG; II) Água Clara – MS e III) Brasília - DF.

Subfamília	Espécie	Área
Formicinae	<i>Brachymyrmex</i>	
	sp.1	I, II e III
	sp.2	II e III
	<i>Camponotus</i>	
	<i>atriceps</i> Fabricius 1804	I, II e III
	<i>aff. blandus</i> Fr. Smith 1858	I e III
	<i>crassus</i> Mayr 1887	I, II e III
	<i>lespesii</i> Forel 1886	I e III
	<i>leydigi</i> Forel 1886	I e III
	<i>punctatus</i> Forel	I, II e III
	<i>renggeri</i> Emery 1894	I, II e III
	<i>rufipes</i> Fabricius 1775	I, II e III
	<i>sericeiventris</i> Guerin 1838	I e III
	sp.1	I e III
	sp.2	I e III
	sp.3	I, II e III
	sp.4	I, II e III
	sp.5	I, II e III
	sp.6	I, II e III
Ponerinae	<i>Ectatomma</i>	
	<i>opaciventre</i> Roger 1861	I, II e III
	<i>permagnum</i> Forel	I, II e III
	<i>tuberculatum</i> (Olivier)	I, II e III
	<i>Pachycondyla</i>	
	<i>foedita</i> (Linnaeus)	I e III
	<i>obscuricornis</i> (Emery)	I e III
	<i>striata</i> Fr. Smith	I e III
	<i>villosa</i> (Fabricius)	I, II e III
Dolichoderinae	<i>Azteca</i>	
	sp.	I, II e III
Pseudomyrmecinae	<i>Pseudomyrmex</i>	
	<i>gracilis</i> (Fabricius) 1804	I, II e III
Myrmicinae	<i>Atta</i>	
	<i>sexdens</i> (Forel)	I, II e III
	<i>Cephalotes</i>	
	<i>atratus</i> Linnaeus 1758	I e III
	<i>clypeatus</i> (Fabricius) 1804	I, II e III
	<i>pusillus</i> (Klug) 1824	I, II e III
	<i>simillimus</i> (Kempf)	I, II e III

	sp.	II
<i>Crematogaster</i>	<i>victima</i> (Smith)	I, II e III
	sp.1	II
	sp.2	II
<i>Pheidole</i>	sp.1	II
	sp.2	I, II e III
<i>Solenopsis</i>	sp.1	II
	sp.2	I, II e III

Foram observados herbívoros pertencentes a 15 famílias para as três áreas (Tabela 2). Essas diversas espécies de herbívoros foram encontradas nas plantas, sendo rara a abundância de uma espécie em particular, com exceção para Água Clara – MS, onde prevaleceram Vatidae, Pieridae, Scolytidae e Curculionidae. Os principais herbívoros foliares foram Coleoptera e Lepidoptera, enquanto que os florais foram Thysanoptera e Coleoptera.

Tabela 2. Morfoespécies de herbívoros encontrados em indivíduos experimentais de *Ouratea spectabilis* (Ochnaceae) entre outubro de 2006 à fevereiro de 2008. Para áreas: I) Uberlândia – MG, II) Água Clara – MS e III) Brasília - DF.

Ordem	Família	Espécie	Estrutura atracada	Áreas
Coleoptera	Curculionidae	<i>Anthonomus ourateae</i>	botões e flores	I, II e III
		<i>Anthonomus</i> sp.1	botões e flores	I, II e III
		<i>Anthonomus</i> sp.2	botões e flores	I, II e III
		<i>Anthonomus</i> sp.3	botões e flores	I, II e III
		<i>Anthonomus</i> sp.4	botões e flores	I, II e III
		<i>Anthonomus</i> sp.5	botões e folhas	II
Diptera	Scolytidae	<i>Zygopinae</i> sp.	botões e folhas	I e III
	Cecidomyiidae	<i>Contarinia</i> sp.	botões/brotos	I e III
	Dolichopodidae	Dolichopodidae sp.	brotos/ NEF	II
	Stratiomyidae	<i>Chiromysa</i> sp.	brotos	II
Homoptera	Membracidae	Membracidae sp.1	raquis das panículas	I, II e III
		Membracidae sp.2	raquis das panículas	I e III
		Membracidae sp.3	raquis das panículas	I e III
		Membracidae sp. 4	raquis das panículas	I e III
		Membracidae sp.5	raquis das panículas	I e III
Lepidoptera	Lycaenidae	Lycaenidae sp.	folhas jovens	I, II e III
	Pieridae	Pieridae sp.	folhas e botões	II
	Hesperiidae	Hesperiidae sp. 1	folhas jovens	I e III
		Hesperiidae sp. 2	folhas jovens	I e III
		Hesperiidae sp. 3	folhas jovens	I e III
		Hesperiidae sp. 4	folhas jovens	II
		Hesperiidae sp. 5	folhas jovens	I, III
Mantodea	Vatidae	Vatidae sp.	folhas	II
Orthoptera	Gryllidae	Gryllidae sp.	folhas	I, II e III
	Acrididae	Acrididae sp.	folhas	I, II e III
Phasmida	Phasmatidae	Phasmatidae sp.	folhas	II
	Timemmatidae	Timemmatidae sp.	folhas	I, II e III
Thysanoptera	Thripidae	<i>Frankliniela</i> sp.	flores	I, II e III
		Thripidae sp.1	flores	II
		Thripidae sp.2	flores	I e III

Os resultados dos experimentos avaliando a presença ou ausência da ação da interação formiga-planta, ao longo do tempo, sobre a herbivoria, mostraram que a presença de formigas visitantes dos NEFs de *O. spectabilis* reduziu significativamente a herbivoria foliar nas três áreas. A herbivoria nos ramos sem formigas foi significativamente maior e oscilou ao longo do tempo, tanto na área de Uberlândia ($F = 2780,312$; $gl = 1$; $p < 0,0001$; ANOVA para medidas repetidas), quanto na área Água Clara ($F = 3803,915$; $gl = 1$; $p < 0,0001$; ANOVA para medidas repetidas) e Brasília ($F = 3594,859$; $gl = 1$; $p < 0,0001$; ANOVA para medidas repetidas). O padrão de dano foliar, em ambas as áreas, na presença ou ausência de formigas foi similar (Figura 7).

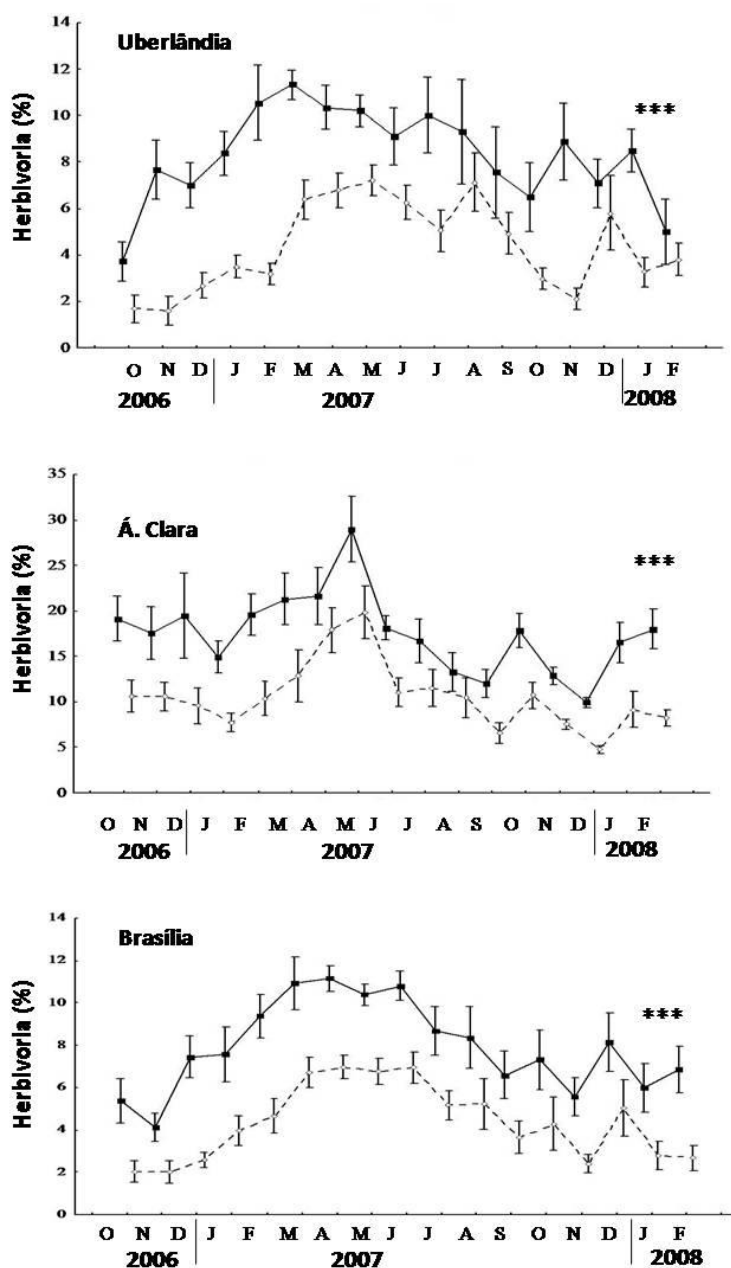


Figura 7. Comparação entre a porcentagem média de herbivoria em ramos de *Ouratea spectabilis* (Ochnaceae) na presença (linhas - - -) e na ausência (linhas —) de formigas visitantes nas áreas de Uberlândia, Água Clara e Brasília entre outubro de 2006 à fevereiro de 2008. O símbolo “***” indica que as médias diferiram significativamente entre os grupos ($p < 0,001$; ANOVA para medidas repetidas).

Nas três áreas experimentais, à visitação de formigas também foi relevante para a aptidão da planta. Ramos com formigas formaram mais frutos por botões produzidos ($P = 0,001$) (Figura 8). Também foi evidenciada diferença na quantidade de sementes produzidas por frutos entre áreas com a presença de formiga ($U = 56,000$, $P = 0,0005$) ou ausência de formigas ($U = 315,500$, $P = 0,001$) (Figura 9). Na região de Água Clara foi contabilizado um número médio inferior de frutos e sementes.

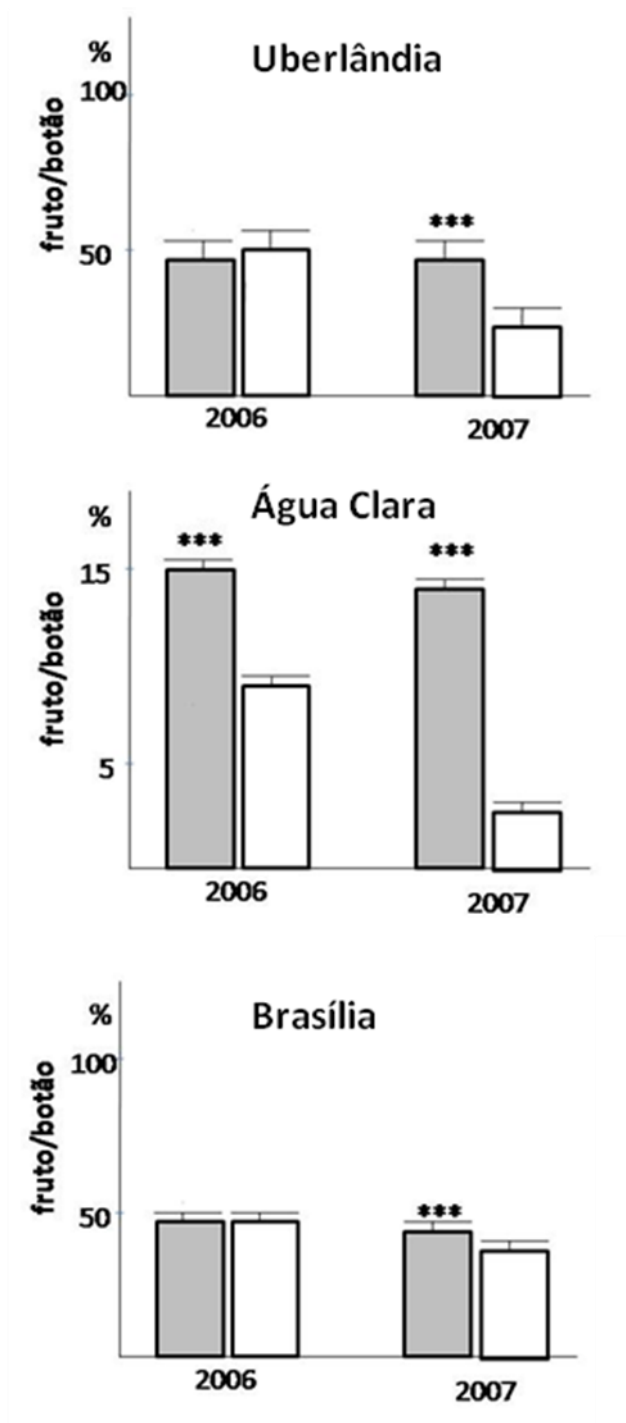


Figura 8. Comparação entre a taxa média de frutos formados por botões produzidos de *Ouratea spectabilis* (Ochnaceae) na presença (barras cinza) e na ausência (barras vazia) de formigas visitantes dos nectários extraflorais. Para áreas: A) Uberlândia – MG; B) Água Clara – MS e C) Brasília - DF. (***) indicam diferença significativa entre os dados (Teste U de Mann-Whitney, $p < 0,001$).

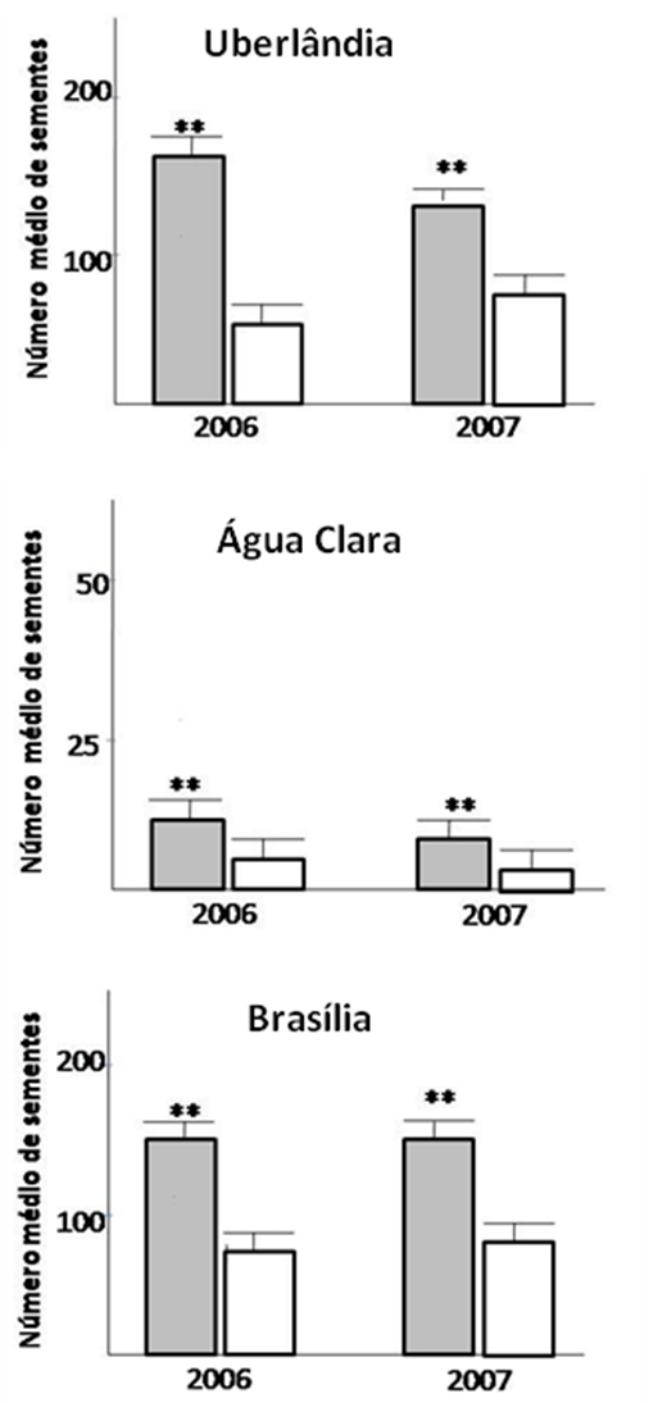


Figura 9 – Comparação entre o número médio de sementes produzidos de *Ouratea spectabilis* (Ochnaceae) na presença (barras cinza) e na ausência (barras vazia) de formigas visitantes. Para áreas: A) Uberlândia – MG; B) Água Clara – MS e C) Brasília - DF (**) indicam diferença significativa entre grupos (Teste U de Mann-Whitney, $p < 0,001$).

4. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo corroboram a maioria das observações de outros autores, que listam as espécies de formigas associadas às plantas extra-nectaríferas do Cerrado (OLIVEIRA & BRANDÃO 1991; OLIVEIRA & FREITAS 2004; OLIVEIRA & DEL-CLARO, 2005; BYK, 2006), sendo o gênero *Camponotus* o mais abundante e o mais bem distribuído também entre as formigas visitantes de *O. spectabilis*, nas três áreas de estudo. Espécies de *Camponotus* podem ter sucesso na utilização de NEFs, principalmente devido a maior agressividade e característico comportamento exploratório do ambiente (DEL-CLARO & OLIVEIRA 2000). Por exibirem comportamentos agressivos direcionado aos herbívoros, formigas podem afetar positivamente o valor adaptativo das plantas por reduzirem os danos causados às partes vegetativas (FEDERLE *et al.*, 1998; KOPTUR, 1992 OLIVEIRA *et al.*, 1987) e reprodutivas (DEL-CLARO *et al.*, 1996). Os resultados dos experimentos de campo mostraram que isso é também verdadeiro para na associação entre formigas e *O. spectabilis* no cerrado, havendo redução da herbivoria e maior produção de frutos e sementes nos ramos visitados por formigas. FREITAS & OLIVEIRA (1996) demonstraram que a simples presença de formigas na planta pode ter um impacto significativo reduzindo a presença de lepidópteros em *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae). No entanto, em outro estudo (Capítulo II), mostra que há formigas que apresentam efeito nulo, ou seja, nem todas as espécies prestam serviços de proteção e cada espécie deve ter seu comportamento e suas limitações biológicas levados em consideração (SENDOYA *et al.* 2009). A maioria das espécies são coleções de populações diferenciadas geneticamente e a maioria das espécies envolvidas na interação não apresenta variações geográficas idênticas, como proposto por THOMPSON (2005). As espécies que interagem são filogeneticamente próximas, como vemos claramente na Tabela 1.

As áreas de Uberlândia e Brasília apresentam histórico de queimadas periódicas (geralmente num intervalo de dois a cinco anos), bem como estas áreas também apresentam períodos de seca anuais, como pode ser visto na Figura 4. Isso talvez possa explicar a maior espessura do súber nas plantas nessas áreas. O súber parece ser um importante local de nidificação para artrópodes, principalmente formigas (Figura 6A). Em um estudo BYK (2006) demonstra que o fogo parece não afetar as atividades internas da colônia, pois o súber não é queimado em sua totalidade. MORAIS, (1980) mostrou que diversas espécies de formigas nidificam em troncos ocos ou ramos mortos

de plantas de cerrado. OLIVEIRA E LEITÃO-FILHO (1987) sugerem que os orifícios deixados por larvas de besouros são ocupados por colônias de formigas em árvores do cerrado. No entanto, isso não foi encontrado para plantas de Água Clara, onde os ninhos estavam no solo ou em envoltórios foliares construídos por lagartas de Lepidoptera na própria planta (Figura 5A). O tempo de duração destes, em média 14 meses, permite que novos envoltórios sejam construídos e assim a transferência de ninho seja realizada. O comportamento destas formigas parece ser fundamental para estabelecer uma interação, neste caso, a nidificação. Para as áreas de Uberlândia e Brasília, estas nidificaram nos troncos e súber e as mesmas espécies em Água Clara utilizaram os envoltórios, ou seja, o comportamento de nidificação mudou de uma região para outra, porém, nas três áreas os NEFs de *O. spectabilis* estavam ativos nas partes jovens da planta. De uma forma ou de outra, parece que formigas tendem a se estabelecer o mais próximo da fonte de alimento, o néctar extrafloral, o que reflete em diferenças regionais no comportamento, porém não resultando em diferenças na interação estabelecida nas diferentes áreas. Este tipo de resultado já foi mostrado por Thompson (1999; 2001), onde parasitóides também diferiram em termos de comportamento em como eles procuram por larvas do hospedeiro escondidas dentro dos tecidos reprodutivos e vegetativos da planta, porém o resultado final da interação é o mesmo.

A variação climática é perceptível se compararmos Uberlândia e Brasília com Água Clara. Esta última área apresenta índices pluviométricos consideráveis durante todo o ano. No verão, as temperaturas são mais altas, e, no inverno, mais baixas que as demais áreas. Isso pode explicar a baixa quantidade de súber encontrado em indivíduos experimentais de Água Clara (ambiente mais úmido) e a grande quantidade de súber nas demais, onde a quantidade de água é limitada durante o inverno. Visivelmente, folhas jovens foram mais frequentes nesta área. Talvez seja o motivo para que o ataque tenha sido mais intenso quando comparado as áreas de Uberlândia e Brasília. Mesmo assim, os benefícios da associação com formigas para *O. spectabilis* se mantém ao longo do tempo nas três áreas, como mostram os resultados da ANOVA (Figura 7) e podem se intensificar com o aumento da fauna de herbívoros, característico do final da primavera e início do verão nos trópicos (MARQUIS & BRAKER, 1994). Associações entre plantas, predadores e herbívoros podem, muitas vezes, apresentar resultados condicionais, ou seja, dependentes de fatores bióticos e abióticos do ambiente (BARBOSA & BRONSTEIN, 2002; OLIVEIRA & DEL-CLARO, 2005; Bronstein, 2008). A interação parece ser igualmente vantajosa e importante para formigas e plantas nas três áreas, dependendo da presença ou não de formigas. Interações entre formigas e plantas extra-nectaríferas,

geralmente, diferem fenotipicamente e ecologicamente como já mostrados em estudo de HARVEY (1996) e HEDDERSON e LONGTON (1996).

As folhas jovens, em geral são mais vulneráveis à ação de herbívoros, pois compostos secundários se acumulam com o desenvolvimento das folhas (COLEY & BARONE, 1996). Em diversas espécies vegetais do cerrado é comum que os NEFs estejam especialmente ativos em folhas jovens (OLIVEIRA & PIE, 1998; DEL-CLARO, 2004). Assim sendo, durante a rebrota, as folhas novas de *O. spectabilis* são tão atrativas para os herbívoros, quanto o são para as formigas, por terem os NEFs ativos. Na área de Água Clara, foi perceptível a presença de alguns herbívoros mais constantes e seu impacto sobre *O. spectabilis* mais intenso. Isto mostra as possibilidades para se criar diferenças entre populações na média e a distribuição de efeitos são quase infinitas, levando quase inevitavelmente à estrutura de mosaico geográfico em qualquer interação interespecífica que persista por longos períodos de tempo, como proposto por THOMPSON, (2005). O mesmo autor sugere que algumas populações que sofrem ataques mais específicos podem mostrar níveis muito baixos de defesa. Estes níveis podem indicar que a espécie é uma presa completamente nova, ou que a espécie é uma presa previamente usada que perdeu suas defesas durante o período de tempo que o predador, neste caso, certos herbívoros, focam seu ataque sobre outras espécies por determinados períodos (THOMPSON, 2005). Com relação aos demais grupos de herbívoros, percebemos que se tratam de muitas espécies em comum nas três áreas ou de grupos taxonômicos próximos, corroborando em parte as expectativas de THOMPSON, (2005). Isto demonstra que o processo evolutivo de uma espécie ou táxon superior tem influência direta e causal sobre a ecologia e comportamento daquele táxon, tanto na distribuição, abundância e dinâmica populacional (PRICE, 2003).

Na interação estudada, podemos perceber que populações de herbívoros têm preferências, como folhas, botões e brotos. Talvez *Ouratea spectabilis* seja geneticamente desprotegida em relação a outras plantas em potencial, conforme proposto por THOMPSON (2005). SIMMS E RAUSHER (1993) sugerem que a seleção natural pode agir de forma a otimizar o fitness entre intervalos em interações. Isso talvez explique a diferente proporção na produção de frutos e sementes comparadas entre um ano e outro. THOMPSON & GOMULKIEWICZ (2000) discutem que dinâmicas coevolucionárias podem ser direcionadas em parte pela escala espacial de sincronia em flutuações entre comunidades que se avizinham e podem estar em sincronia mais próxima do que em populações que estão distantes. É o que vemos nos resultados de

Uberlândia e Brasília, quando comparados à área de Água Clara. Percebemos também que há preferência entre os herbívoros em escalas geográficas e que estas populações de plantas possuem altos níveis de defesa, através da associação com diversas espécies de formigas, fornecendo evidência de associação há muito tempo. Essa colocação foi proposta na Teoria dos Mosaicos Geográficos da Coevolução e agora pudemos constatar-la em campo. Às vezes uma subdivisão substancial pode ocorrer em escalas de poucos quilômetros, enquanto que em outras espécies o fluxo genético substancial ocorre ao longo de grandes escalas, criando parte da matéria prima para o mosaico geográfico de coevolução. Estamos apenas começando a entender como a subdivisão de populações afeta a dinâmica coevolucionária dentro das regiões na Terra, sendo o presente estudo um primeiro passo no ambiente tropical (THOMPSON, 2005).

THOMPSON (2005) discute a manutenção dos resultados de interações coevolutivas entre animais e plantas, mostrando que, muitas vezes, as mesmas espécies ou espécies semelhantes se associam em distintas áreas, com resultados semelhantes. Foi o que encontramos na interação *O. spectabilis*-formigas-herbívoros. Isso demonstra que essas relações parecem ter um passado evolutivo comum, às vezes explicado pela origem de distribuição geográfica comum, às vezes por limitações físicas ou fisiológicas que se refletem através dos seus fenótipos e as aproximam nas relações filogenéticas (THOMPSON, 2005). Dessa forma, podemos perceber que muitas espécies representam coleções de diferentes populações genéticas que tornam cada população um pequeno experimento evolutivo e cada interação local interespecífica um experimento coevolutivo em potencial (THOMPSON, 2005). É o que vemos claramente na interação *O.spectabilis*-formigas-herbívoros, corroborando a Teoria dos Mosaicos Geográficos de Coevolução, como proposto por Thompson (2005). Os resultados tiveram o mesmo significado tanto para plantas (proteção a folhas, frutos e sementes) quanto para formigas (baseado no capítulo I), independente da variação geográfica. Embora haja mudanças nas características geográficas, ambientais, em algumas espécies visitantes (formigas e herbívoros), incluindo o comportamento, os resultados são os mesmos para as interações de diferentes tipos de formigas e herbívoros, sobre uma mesma planta, nas três áreas estudadas. Isso sugere que se um tipo de interação é resultado de coevolução, o conjunto de elementos interagentes estão sujeitos as pressões seletivas semelhantes que conduzirão a interação para um mesmo resultado, neste caso uma relação mutualística, que permanece por longos períodos de tempo.

3 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALA-ROBERTS, L., AND V. PARRA-TABLA (2005) **Artificial defoliation induces trichome production in the tropical shrub *Cnidoscolus aconitifolius* (Euphorbiaceae).** *Biotropica* 37: 251-257.
- ARAÚJO, G.M.; BARBOSA, A.A.A; ARANTES, A. A. & AMARAL, A.F.(2002) **Composição florística de veredas no município de Uberlândia, MG.** *Revista Brasileira de Botânica.* v. 25, p.475-493.
- BRONSTEIN J.L. AND P. BARBOSA. (2002) **Multi-trophic/multi-species mutualistic interactions: the role of non-mutualists in shaping and mediating mutualisms.** Pp. 44-65 in *Multitrophic Level Interactions*. B. Hawkins and T. Tscharnkte (editors), Cambridge University Press.
- BEGON, M.; HARPER, J. L.& TOWNSEND, C. R. (1990) **Ecology: individuals, populations and communities.** Blackwell Scientific Publications, Oxford, 945 pp.
- BENTLEY, B. L. (1977) **Extrafloral nectaries and pugnacious bodyguards.** *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 8:407-427.
- BRONSTEIN. J.L. (1998) **The contribution of ant-plant protection studies to our understanding of mutualism.** *Biotropica* 30: 150-161.
- BRONSTEIN, J.L. AND HOLLAND, J.N. (2008) **Mutualism.** *Encyclopedia of Ecology*, Vol. 3 (eds S.E. Jorgensen& B.D. Fath), pp. 2485–2491. Elsevier, Oxford.
- BYK, J. (2006) **Interações entre formigas e *Ouratea spectabilis* (Ochnaceae) na vegetação de cerrado: variação sazonal e efeito do fogo.** Diss Mestrado. 37p.
- COLEY, P. D., AND BARONE, J. A. (1996) **Herbivory and plant defenses in tropical forests.** *Annual Review of Ecology and Systematics* 27:305-335.

- COSTA, F.M.C.B., A.T. OLIVEIRA-FILHO & OLIVEIRA, P.S. (1992) **The role of extrafloral nectaries in *Qualea grandiflora* (Vochysiaceae) in limiting herbivory: an experiment of ant protection in cerrado vegetation.** Ecol. Ent. 17:363-365.
- CRAWLEY, M. J. (1997) Plant- herbivore dynamics. In: Plant ecology, ed. Crawley. M.J. United Kingdom, Cambridge. 2ª ed. P. 401-474.
- CRAWLEY, M.J. (1983) **Herbivory: the dynamics of animal-plant interactions.** Blackwell Scient. Publ. Oxford.
- CUAUTLE, M. AND RICO-GRAY, V. (2003) **The effects of wasps and ants on the reproductive success of the extrafloral nectaried plant *Turnera ulmifolia* (Turneaceae).** Functional Ecology 17:417-423.
- DAVIDSON, D. W. S.; C. COOK,& SNELLING, R. R. (2004) **The role of resource imbalances in the evolutionary ecology of tropical arboreal ants.** Biol. J. Linn. Soc. 61: 153-181.
- DEL-CLARO, K.; BERTO, V. & RÉU, W. (1996) **Effect of herbivore deterrence by ants on the fruit set of an extrafloral nectary plant, *Qualea multiflora* (Vochysiaceae).** Journal of Tropical Ecology 12: 887-892.
- DEL-CLARO K (2004) Multitrophic relationships, conditional mutualisms, and the study of interaction biodiversity in tropical savannas. Neotrop Entomol 33: 665-672.
- DEL-CLARO, K. AND OLIVEIRA, P.S. (2000) **Conditional outcomes in a neotropical treehopper-ant association: temporal and species-specific variation in ant protection and homopteran fecundity.** Oecologia 124: 156-165.
- DEL-CLARO, K. AND TOREZAN-SILINGARDI, H.M. (2009) **Insect-Plant Interactions: New Pathways to a Better Comprehension of Ecological Communities in Neotropical Savannas.** Neotropical Entomology, 38(2):159-164.

- EDWARDS, P. J. AND WRATTEN, S. D. (1981) *Ecologia das interações entre plantas e insetos*. Coleção Temas de Biologia, vol. 27. EPV, São Paulo, SP. p. 1 - 56.
- EHRlich, P. R., AND RAVEN, P. H. (1964) **Butterflies and plants: A study in coevolution**. *Evolution* 18:586-608.
- FEDERLE, W.; MASCHWITZ, U. & FIALA, B. (1998) **The two-partner ant-plant system of *Camponotus (Colobopsis)* sp. 1 and *Macaranga puncticulata* (Euphorbiaceae): natural history of the exceptional ant partner**. *Insectes Soc.* 45: 1-16.
- FREITAS, A.V.L. & OLIVEIRA, P.S. (1996). **Ants as selective agents on herbivore biology: effects on the behaviour of a non-myrmecophilous butterfly**. *Journal of Animal Ecology* 65: 205-210.
- FUENRE, M.A.S. AND MARQUIS. R.J. (1999) **The role of ant-tended extrafloral nectaries in the protection and benefit of a Neotropical rainforest tree**. *Oecologia (Berl.)* 118: 191-202.
- GOODLAND, R. AND FERRI, M. G. (1979) **Ecologia do cerrado**. Itatiaia, Belo Horizonte; EDUSP, São Paulo.
- HARVEY, P. H. (1996). **Phylogenies for ecologists**. *Journal of Animal Ecology* 65: 255-263.
- HEDDERSON, T. A., AND R. E. LONGTON. (1996). **Life history variation in mosses: Water relations, size and phylogeny**. *Oikos* 77: 31-43.
- HORVITZ, C. C. AND D. W. SCHEMSKE. (1984). **Effects of nectar-harvesting ants and an ant-tended herbivore on seed production of a tropical herb**. *Ecology* 65:1369-1378.
- JANZEN, D. H. (1966). **Coevolution of mutualism between ants and acacias in Central America**. *Evolution* 20:249-75.

- KEELER, K. H. (1981) **A model of selection for facultative nonsymbiotic mutualism.** *American Naturalist* 118: 488-498.
- KEELER, K. H. (1989) **Ant-plant interactions.** In W. G. Abrahamson (Ed.). Plant-animal interactions, pp. 207-242. McGraw-Hill, New York, 480 pp.
- KOPTUR, S. (1984) **Experimental evidence for defense of *Inga* (Mimosoideae) saplings by ants.** *Ecology* 65 (6): 1787-1793.
- KOPTUR, S. (1992) **Interactions between Insects and Plants Mediated by Extrafloral Nectaries.** In Bernays, E. (ed.) CRC series on Insect/Plant Interactions. Volume 4, pp. 85-132. CRC Press, Boca Raton
- LORENZI, H. (2002) **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil.** Ed. Plantarum LTDA, Odessa, Brasil.
- MARQUIS, R.J. AND BRAKER, H.E. (1994) **Plantherbivory interactions: diversity, specificity, and impact.** In: MC.DADE, L.A. et al. *La selva: Ecology and Natural History of a eotropical Rain Forest*. Chicago Press, Chicago, p. 261-221.
- MORAIS, H.C. (1980) **Estrutura de uma comunidade de formigas arborícolas em vegetação de campo cerrado.** Dissertação de Mestrado, Unicamp, Sp. 123pp.
- OLIVEIRA, P. S. AND BRANDÃO, C. R. F. (1991) The ant community associated with extrafloral nectaries in the brasilian cerrados. Pp. 198-212 (Chapter 14) in HUXLEY, C. R. & CUTLER, D. F. **Ant-plant interactions.** Oxford University Press, Oxford.
- OLIVEIRA, P. S. AND DEL-CLARO, K. (2005) **Multitrophic interactions in a Neotropical savanna: ant-hemiptera systems, associated insect herbivores, and a host plant,** p.414-438. In Biotic Interaction in the Tropics (D. Burslem ed.). Cambridge University Press, British Ecological Society, London, 564p., 2005.
- OLIVEIRA, P. S. AND FREITAS, A. V. L. (2004) **Ant-plant-herbivore interactions in the Neotropical cerrado savanna.** *Naturwissenschaften* 91: 557-570.

- OLIVEIRA, P. S. AND MARQUIS, R.J. (2002) **The cerrados of Brazil: Ecology and natural history of a Neotropical savanna**. Columbia University Press, New York, 398p.
- OLIVEIRA, P. S. AND OLIVEIRA-FILHO, A. T. (1991) **Distribution of extrafloral nectaries in the woody flora of tropical communities in the western Brazil**. In: Plant-animal interactions: evolutionary ecology in tropical and temperate regions. Ed. John Wiley & Sons, New York. p. 163-175.
- OLIVEIRA, P. S. AND PIE, M. R. (1998) **Interaction between ants and plants bearing extrafloral nectaries in Cerrado vegetation**. An. Soc. Entomol. Brasil 27 (2): 161-176.
- OLIVEIRA, P.S. & LEITÃO-FILHO, H.F. (1987) **Extrafloral nectaries: Their taxonomic distribution and abundance in the woody flora of cerrado vegetation in Southeast Brazil**. Biotropica, 19: 140-148.
- OLIVEIRA, P.S.; FREITAS, A.V.L.& DEL-CLARO, K. (2002) **Ant foraging on plant foliage: contrasting effects on the behavioral ecology of insect herbivores**. In: OLIVEIRA, P.S. & MARQUIS, R.J. (Eds.). *The Cerrados of Brazil: ecology and natural history of a neotropical savanna*. New York: Columbia University Press. p.287-305
- OLIVEIRA-FILHO, A. T. AND RATTER, J.A. (2002) **Vegetation physiognomies and woody flora of the cerrado biome**, p.91-120. In Oliveira P S, Marquis R J (eds) *The cerrados of Brazil: ecology and natural history of a neotropical savanna*. Columbia University Press, New York, 398p.
- PRICE, P.W. (2002) **Species interactions and the evolution of biodiversity**, p. 3-25. In C.M. Herrera & O. Pellmyr (eds.), *Plant-animal interactions: An evolutionary approach*. Oxford, Blackwell Science, 425p.
- PRICE, P. W. (2003) **Macroevolutionary theory on macroecological patterns**. Cambridge. University Press, Cambridge.

- RASHBROOK, V.K., COMPTON, S.G. & LAWTON, J.H. (1992) Ant-herbivore interactions: reasons for the absence of benefits to a fern with foliar nectaries. *Ecology* 73 (6):2167-2174.
- RAVEN, P. H., R. F. EVERT, & S. E. EICHHORN. (1986) **Biology of plants**. Worth Publishers, Inc., New York.
- RICKLEFS, R.E. (2003) **A economia da natureza**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 501p.
- SENDOYA, S.F., FREITAS, A.V.L., OLIVEIRA, P.S. (2009). **Egg-laying butterflies distinguish predaceous ants by sight**. *Amer. Nat.* 174, 134-140.
- SIMMS, E. L., AND M. D. RAUSHER. (1993) **Patterns of selection on phytophage resistance in *Ipomoea purpurea***. *Evolution* 47:950-976.
- GOMULKIEWICZ, R., J. N. THOMPSON, R. D. HOLT, S. L. NUISMER, & M. E. HOCHBERG. (2000) **Hot spots, cold spots, and the geographic mosaic theory of coevolution**. *American Naturalist* 156:156-174.
- THOMPSON, J.N. (1999) **Coevolution and escalation: are ongoing coevolutionary mean derings important?** *American Naturalist* 153: S92-S93
- THOMPSON, J.N. (1999B) **Specific hypotheses on the geographic mosaic of coevolution**. *American Naturalist* 153:S1-S14.
- THOMPSON, J. N. (2001) **The geographic dynamics of coevolution**. Paginas 331-343 in C.W. Fox D.A. Roff, and D.J. Fairbairn, eds., *Evolutionary Ecology: Concepts and Case Studies*. Oxford Univerity Press, Oxford.
- THOMPSON, J.N. (2005) **The geographic mosaic of coevolution**. University of Chicago Press, Chicago, 443p.

Considerações Gerais

Dados como os aqui apresentados (capítulo I) e discutidos, fornecem a primeira evidência de que néctar extrafloral pode ter um impacto significativo sobre a sobrevivência, crescimento, desenvolvimento e reprodução de uma espécie de formiga. Durante muitos anos houve uma grande especulação sobre o real ganho de formigas visitantes de NEFs o qual conseguimos demonstrar através da manipulação experimental. Através deste estudo, ficou evidente que os benefícios são recíprocos, onde formigas ganham através do alimento obtido e plantas podem ganhar com esta visitação. A formiga *Cephalotes pusillus* é o primeiro caso no qual temos uma real evidência de que o néctar extrafloral melhora o crescimento e desenvolvimento da colônia. Podemos provar dessa forma que de fato é uma interação onde formigas conseguem benefícios alimentando-se de néctar extrafloral.

Mostramos em um estudo claro que não são todas as formigas que visitam NEFs prestam algum tipo de proteção à planta. Através do capítulo II, conseguimos provar que há formigas que parasitam o sistema formigas-planta-herbívoro. *Cephalotes pusillus* são limitadas morfológicamente para agir como predadores efetivos. Não apresentam uma boca adaptada eficientemente para o agarramento, mordida ou corte de presas animais, além de apresentarem comportamento de fuga quando algum herbívoro estiver próximo. Consomem o néctar extrafloral e pólen, nidificam na planta e não conferem cuidado às folhas e partes reprodutivas como comumente relatado em plantas com NEFs e formigas visitantes.

No último capítulo foram demonstradas experimentalmente as interações entre *Ouratea spectabilis*–formigas-herbívoros em três áreas simultaneamente, onde constatamos que o resultado é o mesmo para a proteção de folhas e parte reprodutivas por formigas. Foram encontradas diferenças comportamentais nas espécies, principalmente em formigas, porém, o resultado ecológico é o mesmo. Ao longo dos gradientes ambientais, as interações se mantêm ao longo do tempo. Muitas das espécies de formigas e herbívoros são as mesmas e quando espécies diferentes, estas são próximas filogeneticamente. Constatamos que as espécies de formigas estabelecem a visitação com os mesmos organismos, independentemente da região geográfica. Isso mostra

um elo muito forte nesta interação, corroborando com a Teoria dos Mosaicos Geográficos da Coevolução, proposto por Thompson (2005).

Foram perceptíveis os efeitos variáveis entre habitats em interações pareadas entre espécies, incluindo trapaças na rede por parte de uma espécie (*Cephalotes pusilus*), corroborando com a teoria proposta por Thompson (2005). Isso demonstra a necessidade de estudos básicos e contínuos a serem desenvolvidas no Cerrado para compreendermos o funcionamento das interações e conseqüente inserirmos planos de conservação da biodiversidade.