



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

CÍCERO LUANDERSON DA SILVA ALENCAR

**VARIAÇÃO INTERESPECÍFICA DOS NECTÁRIOS EXTRAFLORAIS: COMO O
MUTUALISMO DE PROTEÇÃO COM FORMIGAS É REGULADO EM TRÊS
ESPÉCIES DE *CHAMAECRISTA* NA CAATINGA?**

FORTALEZA

2021

CÍCERO LUANDERSON DA SILVA ALENCAR

VARIAÇÃO INTERESPECÍFICA DOS NECTÁRIOS EXTRAFLORAIS: COMO O
MUTUALISMO DE PROTEÇÃO COM FORMIGAS É REGULADO EM TRÊS ESPÉCIES
DE *CHAMAECRISTA* NA CAATINGA?

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais. Área de concentração: Ecologia e Recursos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Ítalo Antônio Cotta Coutinho.

Coorientador: Prof. Dr. Anselmo Nogueira.

FORTALEZA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- A353v Alencar, Cícero Luanderson da Silva.
Variação interespecífica dos nectários extraflorais: como o mutualismo de proteção com formigas é regulado em três espécies de *Chamaecrista* na caatinga? / Cícero Luanderson da Silva Alencar. – 2021.
59 f. : il.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Fortaleza, 2021.
Orientação: Prof. Dr. Ítalo Antônio Cotta Coutinho.
Coorientação: Prof. Dr. Anselmo Nogueira.
1. Interações mutualistas. 2. Defesas indiretas. 3. Contexto-dependência. 4. Néctar extrafloral. 5. *Chamaecrista*. I. Título.

CDD 577

CÍCERO LUANDERSON DA SILVA ALENCAR

VARIAÇÃO INTERESPECÍFICA DOS NECTÁRIOS EXTRAFLORAIS: COMO O
MUTUALISMO DE PROTEÇÃO COM FORMIGAS É REGULADO EM TRÊS ESPÉCIES
DE *CHAMAECRISTA* NA CAATINGA?

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais. Área de concentração: Ecologia e Recursos Naturais.

Aprovada em: ___/___/___.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ítalo Antônio Cotta Coutinho (orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Laura Carolina Leal de Sousa
Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)

Dr. Ricardo Eduardo Vicente
Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT)

Profa. Dra. Roberta Boscaini Zandavalli
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dedico àqueles que sempre foram os pilares da minha formação humana, fonte de valores e virtudes que me tornam um ser humano melhor a cada dia, meus pais. Pai e Mãe, essa conquista também é de vocês.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, autor da minha existência, por me permitir sonhar e alcançar este momento, pela coragem e ânimo que me fizeram chegar até aqui, pela fé que me sustenta, pelo auxílio e amparo nos momentos tão difíceis em que Ele foi o meu maior sustentáculo.

Aos meus amados pais, **Cícero** e **Luciene**, pelo amor, apoio e incentivo nas minhas decisões, pelo respeito aos meus momentos de reclusão, por todos os ensinamentos e virtudes que me constroem como pessoa. Eles são a minha maior fonte de inspiração e força, são o alicerce para construção do meu futuro.

Às minhas irmãs, **Lauane** e **Layres**, pelo amor e momentos de boa convivência, nos quais aprendemos juntos a importância de cuidar, compartilhar, sermos honestos, respeitar e querer o bem do nosso semelhante.

Ao meu orientador, Prof. **Ítalo Antônio Cotta Coutinho**, pelo acolhimento desde o estágio, por acreditar e confiar no meu trabalho, por me apresentar o maravilhoso mundo das interações planta-formiga, pelas histórias compartilhadas, pelos cafezinhos sem açúcar, pelos campos sempre tão agradáveis, pela paciência, ensinamentos (científicos e de vida), críticas e sugestões para a construção e melhoria desta dissertação.

Ao meu coorientador, Prof. **Anselmo Nogueira**, pelas críticas tão pertinentes na ocasião da qualificação, pela acolhida e treinamento quando estive em São Bernardo do Campo-SP, pelos “puxões de orelha”, pelas horas a fio discutindo teoria, método e padrões ecológicos, pela paciência de me orientar nas análises estatísticas, na interpretação dos resultados e escrita do texto, pelas correções, sugestões e colaboração que tornaram possível a consolidação deste trabalho.

À **Caroline** (Carol Sol) por me hospedar com tanta boa vontade durante a estadia em São Bernardo-SP, pela amizade linda e preciosa que construímos, pelos desabafos e apoio nos momentos de desespero acadêmico, por sempre estar disposta a ouvir e aconselhar, e por ser uma das pessoas mais lindas, admiráveis e encantadoras que já conheci.

A todo o **peçoal da Fazenda Experimental Vale do Curu** (Pentecoste-CE), pela acolhida tão calorosa e pelos serviços oferecidos que viabilizaram a realização da pesquisa naquele lugar. Um agradecimento muito especial ao **Cícero**, que me auxiliou do começo ao fim nas coletas de campo, pela disponibilidade, entusiasmo, pelos causos engraçados e pela playlist inconfundível que tornavam o trabalho em campo menos fatídico.

Ao meu grande amigo **Livanio Cruz**, pelos momentos de convivência no AP 202 que tornaram a nossa amizade tão forte, pela pessoa maravilhosa que é, pelos conselhos sempre tão assertivos, pela confiança, lealdade e carinho de sempre.

Às minhas atuais *housemates*, **Andreza Ferreira e Paloma Fernandes**, pelo companheirismo, animosidade e respeito, pelos bons momentos de descontração dentro e fora do AP 301, pelos conselhos preciosos e por serem mulheres tão iluminadas.

Aos grandes amigos que a pós me deu, **Alyne, Andrieli, Jorge, Karla, Luana e Sérgio**, por serem pessoas de luz, pela amizade tão verdadeira e carinho tão recíproco, pelos momentos compartilhados de estudos, confraternizações e boas conversas, por serem tão solícitos e prestativos. A convivência com eles tornou a caminhada mais prazerosa e feliz.

Aos **membros da banca examinadora**, pela disponibilidade e solicitude, pelas críticas e contribuições tão oportunas que, certamente, tornarão melhor este trabalho.

A **TODOS** aqueles que fazem parte da minha história de vida e que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse sonho, por sonharem comigo, torcerem por mim e por acreditarem nos meus potenciais.

À **Universidade Federal do Ceará - UFC** e ao **Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais - PPGERN**, pela acolhida e formação em nível de mestrado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001**.

A todos, o meu muito OBRIGADO!

RESUMO

Mutualismos, interações benéficas de exploração recíproca entre espécies, são bastante comuns na natureza e participam de processos ecológicos críticos que operam nas mais diversas escalas, dos indivíduos à ecossistemas. Nessas associações, o contexto ecológico constitui um fator determinante para o resultado dessas interações. Nessa perspectiva, o presente trabalho buscou investigar como o mutualismo de proteção planta-formiga é regulado em três espécies de *Chamaecrista* (Leguminosae) portadoras de nectários extraflorais (NEFs) e nativas da Caatinga brasileira. Para tal, investigamos a influência do tamanho dos NEFs de *C. duckeana*, *C. calycioides* e *C. diphylla* sobre os atributos do néctar extrafloral, e se a produção do néctar é induzida por eventos de herbivoria. Por fim, avaliamos se o padrão de visitação de formigas varia entre as três espécies. Nossas hipóteses foram: 1) as três espécies devem representar um gradiente de disponibilidade de recursos alimentares via NEFs para a assembleia de formigas locais; 2) as três espécies devem aumentar a produtividade dos NEFs após eventos recentes de herbivoria, sendo que a espécie com maiores NEFs deve possuir um maior controle na atividade secretora; e 3) a riqueza e abundância de formigas, especialmente das espécies dominantes, deve ser maior na espécie cujos NEFs são maiores e mais produtivos. O estudo foi realizado em uma área de Caatinga, no município de Pentecoste-CE, Brasil, tendo sido selecionadas 90 plantas focais no campo, 30 plantas de cada espécie de *Chamaecrista*. Em campo, inicialmente quantificamos o número de NEFs ativos em todas as 90 plantas marcadas. Em seguida, realizamos medidas detalhadas do volume e concentração de açúcares do néctar extrafloral em 45 das 90 plantas (15 de cada espécie) e, posteriormente, calculamos a massa total de açúcares. Medimos esses descritores em dois momentos: sob condições de campo e após infligirmos dano foliar. Ao longo de dois meses de campo, realizamos observações e coletas das formigas visitando todas as plantas. No final do trabalho de campo, coletamos uma folha de cada planta focal para medir o tamanho (área total, área secretora e secções) dos NEFs em laboratório. Os resultados demonstraram claramente que a produtividade do néctar varia entre as três espécies, sendo maior em *C. duckeana*, justamente a espécie com maiores NEFs. Ainda, observamos que a herbivoria simulada induziu aumentos na produtividade dos NEFs das três espécies, mas que a magnitude da resposta, principalmente do volume e massa de açúcares, foi maior nas plantas de *C. duckeana*. A diversidade e frequência de visitação das formigas variou entre as três espécies de *Chamaecrista*, tendo sido maior sobre as plantas de *C. duckeana*. Essa espécie se mostrou mais atrativa para as formigas da assembleia local, incluindo para as espécies numericamente dominantes, em virtude da maior produtividade dos seus NEFs. Diante disso,

observa-se que diferenças interespecíficas no tamanho, produtividade e atratividade dos NEFs influenciam diretamente o padrão de diversidade, a hierarquia de dominância das formigas e talvez a qualidade da proteção contra herbívoros que as plantas recebem.

Palavras-chave: interações mutualistas; defesas indiretas; contexto-dependência; néctar extrafloral; *Chamaecrista*.

ABSTRACT

Mutualisms, beneficial interactions of reciprocal exploitation between species, are quite common in nature and participate in critical ecological processes that operate at the most diverse scales, from individuals to ecosystems. In these interactions, the ecological context is a determining component for the result of this association. In this perspective, the present work was set out to investigate how the ant-plant protection mutualism is regulated in three extrafloral nectary bearing We investigated the influence of the size of the extrafloral nectaries on the extrafloral nectar attributes in *Chamaecrista duckeana*, *C. calycioides* and *C. diphylla*, and whether the production of the nectar is induced by herbivory events. Finally, we evaluated whether the ant visitation pattern varies between the three species. species of *Chamaecrista* (Leguminosae) native to the Brazilian Caatinga. Our hypotheses were: 1) the three species must represent a gradient of availability of food resources via extrafloral nectaries (EFN) for the assembly of local ants; 2) the three species are expected to increase the extrafloral nectary productivity after recent herbivory events, and the species with the largest ENFs must present the greatest control in secretory activity; and 3) ant richness and abundance, especially for the dominant species, must be greater in the species whose extrafloral nectaries are larger and more productive. The study was carried out in an area of Caatinga, in the municipality of Pentecoste-CE, Brazil, based on 90 focal plants selected in the field, 30 plants of each species of *Chamaecrista*. In the field, we initially quantified the number of active EFN in all 90 plants. Then, we carried out detailed measurements of the volume and concentration of sugars in the extrafloral nectar of 45 out of the 90 plants (15 plants of each species) and, subsequently, calculated the total mass of sugars. We measured these descriptors at two moments: under field conditions and after inflicting leaf damage. Over the course of two months in the field, we conducted observations and collections of ants visiting the plants on all plants. At the end of the fieldwork, we collected one leaf from each focal plant to measure their size (total area, secretory area and sections) of the EFNs in the laboratory. The results clearly demonstrated that the nectar productivity varies among the three species, being higher in *C. duckeana*, the species with the largest EFNs. Also, we observed that the simulated herbivory induced increases in the productivity of nectar for all three species, but that the magnitude of the response, mainly of the volume and mass of sugars, was greater for *C. duckeana*. The diversity and frequency of visitation of the ants varied among the three species of *Chamaecrista*, being greastes on the plants of *C. duckeana*. This species proved to be more attractive to the ants of the local assembly, including to the numerically dominant species, due to the higher productivity of their

EFNs. Therefore, it is observed that interspecific differences in the size, productivity and attractiveness of EFNs directly influence the pattern of diversity, the dominance hierarchy of ants and perhaps the quality of protection against herbivores that plants receive.

Keywords: mutualistic interactions; indirect defense; context dependency; extrafloral nectar; *Chamaecrista*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	13
2 INTRODUÇÃO	20
3 MATERIAL E MÉTODOS	24
4 RESULTADOS	31
5 DISCUSSÃO	34
6 CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS	43
APÊNDICE A - TABELAS	50
APÊNDICE B - GRÁFICOS E FIGURAS	52
APÊNDICE C - MATERIAL SUPLEMENTAR	59

1 INTRODUÇÃO GERAL

Mutualismos são interações de exploração recíproca que resultam em benefício líquido para os indivíduos das espécies envolvidas (BRONSTEIN, 2015). Tais interações envolvem a troca de recursos e/ou serviços que seriam muito caros de serem adquiridos ou produzidos de forma independente (BRONSTEIN, 2001). O efeito líquido do mutualismo (benefício da interação menos seu custo) é alterado pela variação, no espaço e no tempo, na magnitude dos custos ou benefícios da interação (BRONSTEIN, 1998), tornando o resultado dessa interação fortemente dependente do contexto ecológico (BRONSTEIN, 1994). Nessa perspectiva, os mutualismos se mantêm sob condições nas quais os benefícios superam os custos (LEIGH JR., 2010). Os parceiros mutualistas são responsáveis por serviços ecossistêmicos importantes, tais como proteção contra antagonistas, polinização, dispersão de sementes e ciclagem de nutrientes (BRONSTEIN, 2015; LEIGH JR., 2010; PACELHE *et al.*, 2019). Dessa forma, a ocorrência de mutualismos nos sistemas naturais desempenha um papel essencial para a reprodução, sobrevivência e aptidão de algumas espécies (NASCIMENTO; DEL-CLARO, 2010), bem como para estabilidade de comunidades sob perturbação (NUISMER; WEEK; AIZEN, 2018) e resiliência dos sistemas ecológicos (ANGELINI *et al.*, 2016).

Um mutualismo bastante estudado é o de proteção entre formigas e plantas com nectários extraflorais (NEFs) (RICO-GRAY; OLIVEIRA, 2007). Os NEFs, glândulas secretoras não relacionadas à polinização, produzem o néctar extrafloral, um recurso rico em carboidratos e outros solutos responsáveis pela atração e nutrição de diversos grupos de artrópodes predadores, sobretudo formigas (MARAZZI; BRONSTEIN; KOPTUR, 2013). Ao forragearem nas plantas em busca de néctar extrafloral, as formigas reduzem a atividade de herbívoros, promovendo aumentos na aptidão das plantas por meio de aumentos no desempenho vegetativo e/ou reprodutivo das plantas (BENTLEY, 1977; GONZÁLEZ-TEUBER *et al.*, 2012; NASCIMENTO; DEL-CLARO, 2010). No entanto, alguns estudos mostraram efeitos neutros (NOGUEIRA *et al.*, 2012) e até negativos (BYK; DEL-CLARO, 2010) da visitação das formigas nas plantas. Essas variações no resultado da interação demonstram a natureza condicional e facultativa dos mutualismos entre plantas e formigas (BRONSTEIN, 1998).

As espécies de plantas portadoras de NEFs comumente diferem nas características estruturais dos NEFs e nos atributos do néctar extrafloral (MARAZZI *et al.*,

2019; NICOLSON; NEPI; PACINI, 2007). Essas diferenças podem resultar em variações marcantes na atratividade das plantas e no resultado da interação com formigas (BAKER-MÉIO; MARQUIS, 2012; GONZÁLEZ-TEUBER *et al.*, 2012). Espécies com NEFs de maior tamanho e/ou que secretam maiores quantidades de néctar extrafloral podem atrair um conjunto mais diversificado de formigas em relação àquelas com menores NEFs e menores taxas de secreção de néctar (APPLE; FEENER, 2001; BAKER-MÉIO; MARQUIS, 2012; CALIXTO *et al.*, 2020). Ainda, diferenças na qualidade do néctar relacionadas à concentração e composição de açúcares são elementos críticos para a atração de formigas, dada as demandas e preferências por composições específicas de açúcares do néctar que as formigas possuem (VIDAL; SILVA; SENDOYA, 2019). Além disso, plantas que secretam néctares mais concentrados e com maior conteúdo de açúcares atraem mais eficientemente formigas parceiras (DEL-CLARO *et al.*, 2013; GONZÁLEZ-TEUBER *et al.*, 2012; LANGE; CALIXTO; DEL-CLARO, 2017; SHENOY *et al.*, 2012). Nesses casos, variações nas características estruturais dos NEFs, taxas de secreção e qualidade do néctar podem influenciar a atração de formigas aos NEFs e, conseqüentemente, a eficiência da proteção contra herbívoros que as plantas recebem das formigas (BAKER-MÉIO; MARQUIS, 2012; CALIXTO *et al.*, 2020; GONZÁLEZ-TEUBER *et al.*, 2012).

Considerando a importância das características dos NEFs e do néctar extrafloral para o estabelecimento das interações mutualistas entre planta e formigas, investigar a variabilidade das características dos indivíduos envolvidos que medeiam e sustentam a interação são essenciais para compreender a evolução e o funcionamento de mutualismos facultativos. Diante desse contexto, o objetivo deste trabalho foi investigar como um mutualismo com formigas é regulado em três espécies anuais de *Chamaecrista* Moench (Leguminosae) simpátricas da Caatinga por meio de diferenças no tamanho dos NEFs, quantidade e qualidade do néctar extrafloral.

REFERÊNCIAS

- ANGELINI, C. *et al.* A keystone mutualism underpins resilience of a coastal ecosystem to drought. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2016.
- APPLE, J. L.; FEENER, D. H. Ant visitation of extrafloral nectaries of *Passiflora*: The effects of nectary attributes and ant behavior on patterns in facultative ant-plant mutualisms. **Oecologia**, v. 127, n. 3, p. 409–416, 2001.
- BAKER-MÉIO, B.; MARQUIS, R. J. Context-dependent benefits from ant-plant mutualism in three sympatric varieties of *Chamaecrista desvauxii*. **Journal of Ecology**, v. 100, n. 1, p. 242–252, 2012.
- BENTLEY, B. L. The Protective Function of Ants Visiting the Extrafloral Nectaries of *Bixa Orellana* (Bixaceae). **Journal of Ecology**, v. 65, n. 1, p. 27–38, 1977.
- BRONSTEIN, J. L. Conditional outcomes in mutualistic interactions. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 9, n. 6, p. 214–217, 1994.
- BRONSTEIN, J. L. The Contribution of Ant-Plant Protection Studies to Our Understanding of Mutualism. **Biotropica**, v. 30, n. 2, p. 150–161, 1998.
- BRONSTEIN, J. L. The costs of mutualism. **American Zoologist**, v. 41, n. 4, p. 825–839, 2001.
- BRONSTEIN, J. L. **Mutualism**. first ed. Oxford: Oxford University Press, 2015.
- BYK, J.; DEL-CLARO, K. Nectar- and pollen-gathering *Cephalotes* ants provide no protection against herbivory: A new manipulative experiment to test ant protective capabilities. **Acta Ethologica**, v. 13, n. 1, p. 33–38, 2010.
- CALIXTO, E. S. *et al.* Optimal Defense Theory in an ant-plant mutualism: extrafloral nectar as an induced defense is maximized in the most valuable plant structures. **Journal of Ecology**, v. 109, n. 1, p. 167–178, 2020.
- CONNOR, R. C. The Benefits of Mutualism: A Conceptual Framework. **Biological Reviews**, v. 70, n. 3, p. 427–457, 1995.
- DEL-CLARO, K. *et al.* The importance of natural history studies for a better comprehension of animal-plant interaction networks. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 2, p. 439–448, 2013.
- GONZÁLEZ-TEUBER, M. *et al.* Increased Host Investment in Extrafloral Nectar (EFN) Improves the Efficiency of a Mutualistic Defensive Service. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, 2012.
- LANGE, D.; CALIXTO, E. S.; DEL-CLARO, K. Variation in extrafloral nectary productivity influences the ant foraging. **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, p. 1–13, 2017.
- LEIGH JR., E. G. The evolution of mutualism. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 23, n. 12, p. 2507–2528, 2010.

- MARAZZI, B. *et al.* Extrafloral nectaries in Leguminosae: Phylogenetic distribution, morphological diversity and evolution. **Australian Systematic Botany**, v. 32, n. 6, p. 409–458, 2019.
- MARAZZI, B.; BRONSTEIN, J. L.; KOPTUR, S. The diversity, ecology and evolution of extrafloral nectaries: Current perspectives and future challenges. **Annals of Botany**, v. 111, n. 6, p. 1243–1250, 2013.
- NASCIMENTO, E. A.; DEL-CLARO, K. Ant visitation to extrafloral nectaries decreases herbivory and increases fruit set in *Chamaecrista debilis* (Fabaceae) in a Neotropical savanna. **Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 205, n. 11, p. 754–756, 2010.
- NICOLSON, S. W.; NEPI, M.; PACINI, E. **Nectaries and Nectar**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2007.
- NOGUEIRA, A. *et al.* Do extrafloral nectaries present a defensive role against herbivores in two species of the family Bignoniaceae in a Neotropical savannas? **Plant Ecology**, v. 213, n. 2, p. 289–301, 2012.
- NUISMER, S. L.; WEEK, B.; AIZEN, M. A. Coevolution slows the disassembly of mutualistic networks. **American Naturalist**, v. 192, n. 4, p. 490–502, 2018.
- PACELHE, F. T. *et al.* Nectar quality affects ant aggressiveness and biotic defense provided to plants. **Biotropica**, v. 51, n. 2, p. 196–204, 2019.
- RICO-GRAY, V.; OLIVEIRA, P. S. **The Ecology and Evolution of Ant-Plant Interactions**. Chicago: University of Chicago Press, 2007.
- SHENOY, M. *et al.* Composition of Extrafloral Nectar Influences Interactions between the Myrmecophyte *Humboldtia brunonis* and its Ant Associates. **Journal of Chemical Ecology**, v. 38, n. 1, p. 88–99, 2012.
- VIDAL, M. C.; SILVA, A. K.; SENDOYA, S. F. Foraging preferences of ants on a heterogeneous Brazilian sandy shore habitat. **Ecological Entomology**, v. 44, n. 2, p. 283–286, 2019.

CAPÍTULO 1

Espécies com nectários extraflorais maiores produzem néctar de melhor qualidade e interagem com as melhores formigas parceiras

O presente capítulo/artigo está formatado de acordo com as normas do periódico internacional “Journal of Ecology” (Qualis A1) e será enviado para submissão após defesa e aprovação pela banca examinadora.

Espécies com nectários extraflorais maiores produzem néctar de melhor qualidade e interagem com as melhores formigas parceiras

Cícero Luanderson da Silva Alencar¹, Anselmo Nogueira², Ítalo Antônio Cotta Coutinho¹

¹ Universidade Federal do Ceará, campus do Pici, Centro de Ciências, Departamento de Biologia, Programa de Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Fortaleza, CE, Brasil. E-mails: luandersonbio@alu.ufc.br; italo.coutinho@ufc.br

² Universidade Federal do ABC, campus de São Bernardo, Centro de Ciências Naturais e Humanas, São Bernardo do Campo, SP, Brasil. E-mail: a.nogueira@ufabc.edu.br

*Autor de correspondência: Ítalo Antônio Cotta Coutinho, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil. italo.coutinho@ufc.br

Resumo

1. Diferenças nas características dos nectários extraflorais (NEFs) e do néctar extrafloral são fatores determinantes para a atração e diversidade de formigas parceiras em mutualismos de proteção planta-formiga. Contudo, pouca atenção foi dada acerca das diferenças entre espécies de plantas nos atributos de atratividade dos NEFs frente às formigas parceiras. A natureza induzível do néctar extrafloral como mecanismo de controle e otimização da secreção sob condições de herbivoria também foi pouco explorado entre espécies de planta.

2. Neste trabalho, investigamos a existência de diferenças no tamanho e produtividade dos NEFs em três espécies simpátricas de *Chamaecrista* (*C. duckeana*, *C. calycioides* e *C. diphylla*) e se tais diferenças influenciam a diversidade (riqueza e abundância) e a frequência de visitação das espécies de formigas, incluindo espécies dominantes do sistema. Ainda, averiguamos a existência de resposta induzida do néctar após eventos de herbivoria foliar nas três espécies, e se há diferenças na magnitude da resposta dependendo do tamanho dos NEFs em cada uma das espécies de *Chamaecrista*.

3. O estudo foi conduzido em uma área de Caatinga, onde marcamos 90 plantas (30 de cada espécie). Em 45 dessas plantas (15 de cada espécie) medimos o volume, a concentração e massa

total de açúcares do néctar extrafloral em condições de campo e após herbivoria simulada. Amostragens de formigas foram realizadas nas 90 plantas ao longo de quatro censos. Para determinar o tamanho dos NEFs, realizamos em laboratório as medidas de tamanho (área total, área secretora e secções) dos NEFs de 83 plantas das três espécies de *Chamaecrista*.

4. Consistente com as nossas hipóteses e previsões, a produtividade dos NEFs foi maior nas plantas de *C. duckeana*, que possuem os maiores NEFs. Além disso, as três espécies responderam a herbivoria simulada aumentando a produtividade dos NEFs. Contudo, somente plantas da espécie *C. duckeana* tiveram aumentos em todos os descritores do néctar. Finalmente, os NEFs de plantas de *C. duckeana* foram os mais produtivos e tiveram uma resposta induzida pós-herbivoria mais intensa das plantas, e foram justamente os NEFs que atraíram uma maior diversidade de formigas, incluindo espécies numericamente dominantes, em relação às plantas de *C. calycioides* e *C. diphylla*.

5. Síntese. Nossos resultados demonstram que diferenças nas características dos NEFs e do néctar extrafloral entre as três espécies simpátricas de *Chamaecrista* podem moldar os padrões de diversidade e dominância das formigas parceiras, e, possivelmente, influenciar o resultado das interações planta-formiga nesse sistema. Ademais, o controle sobre a produção de recompensas nas plantas focais pode representar um mecanismo de economia que possivelmente reduz os custos e aumenta os benefícios da produção de defesas indiretas.

Palavras-Chave: interação planta-formiga, nectários extraflorais, defesa induzida, *Chamaecrista*, Caatinga

Abstract

O abstract deste artigo será produzido somente após apresentação do trabalho, para que possamos considerar integralmente as sugestões por parte dos avaliadores da banca.

2 INTRODUÇÃO

Interações mutualistas entre plantas e formigas são bastante diversificadas e frequentes nos sistemas naturais (BRONSTEIN, 1998). A prevalência dessas interações tem sido associada a enorme abundância e diversidade desses organismos (RICO-GRAY; OLIVEIRA, 2007; WARD, 2014), especialmente nas regiões tropicais (OLIVEIRA; FREITAS, 2004; ROSUMEK *et al.*, 2009). Nesses mutualismos, as plantas podem se beneficiar pelos serviços de proteção das formigas contra inimigos naturais (HEIL, 2008), dispersão de sementes (LEVINE *et al.*, 2019) e, menos frequentemente, polinização (DEL-CLARO *et al.*, 2019). Dentre esses mutualismos, o de proteção é o mais comum e, portanto, o mais investigado (BRONSTEIN, 1998; HEIL; MCKEY, 2003; LANAN; BRONSTEIN, 2013). Nesse mutualismo, a planta disponibiliza alimento e/ou abrigo para as formigas em troca de proteção parcial ou permanente (HEIL *et al.*, 2001a; RUDGERS; GARDENER, 2004). O mecanismo de proteção biótica nesse caso ocorre quando as formigas predam, retiram ou reduzem a atividade de inimigos naturais da planta (NASCIMENTO; DEL-CLARO, 2010; ROSUMEK *et al.*, 2009; RUDGERS, 2004).

Algumas teorias foram propostas para explicar a alocação diferencial dos mecanismos de defesa nas plantas ao longo do tempo. Uma das mais influentes é a teoria da defesa ótima (TDO), proposta inicialmente por McKey (1974) e Rhoades (1979). Essa teoria sugere que maiores investimentos em defesa devem ser alocados em tecidos mais valiosos e mais vulneráveis das plantas. De acordo com a TDO, a produção de compostos defensivos pelas plantas é demasiadamente cara (MCCALL; FORDYCE, 2010) e, portanto, deve ser empregada nos tecidos vegetais mais suscetíveis ao ataque de herbívoros e que a perda seja mais custosa (HOLLAND; CHAMBERLAIN; HORN, 2009). Nesse sentido, os mecanismos de defesa das plantas seriam otimizados em tecidos mais vulneráveis ao longo do tempo, dado que os custos da produção dessas defesas seriam compensados pelos benefícios da resistência a herbívoros (RHOADES, 1979). Tem-se demonstrado, por exemplo, que folhas mais jovens e ainda em desenvolvimento são mais bem defendidas quando comparadas a folhas mais velhas na mesma planta (JONES; KOPTUR, 2015; RADHIKA *et al.*, 2008), corroborando as previsões teóricas da TDO. Nos trópicos, as folhas mais jovens são justamente as mais consumidas pelos herbívoros (BIXENMANN; COLEY; KURSAR, 2011; COLEY; ENDARA; KURSAR, 2018). O padrão não é diferente para a defesa biótica exercida pelas formigas visitando os NEFs. Nesse sentido, é esperado também que as plantas tenham mecanismos de aumento dos níveis de defesa

biótica nos tecidos mais vulneráveis (JONES; KOPTUR, 2015), aumentando a atração de formigas logo após o dano ocasionado pelos herbívoros (AGRAWAL; RUTTER, 1998; GONÇALVES-SOUZA, 2016; YAMAWO; SUZUKI; TAGAWA, 2019). Assim sendo, as plantas aumentariam seu investimento em defesa biótica somente nos momentos em que os herbívoros estivessem atacando as plantas. Nesse sentido, os mecanismos de defesa induzida e otimização do funcionamento dos NEFs de acordo com as condições locais diminui a condicionalidade associada a tais interações, evitando o saldo negativo de tais interações nos momentos em que a atividade dos NEFs e a visitação das formigas fossem irrelevantes para a proteção das plantas.

Os nectários extraflorais (NEFs) são as principais estruturas vegetais produtoras de recursos alimentares para as formigas (MARAZZI; BRONSTEIN; KOPTUR, 2013). Essas estruturas, situadas geralmente em órgãos vegetativos e não diretamente associadas a polinização, são especializadas na produção do néctar extrafloral (NICOLSON; NEPI; PACINI, 2007), cuja função está associada a atração de formigas mutualistas (ROY *et al.*, 2017). Dois aspectos fundamentais da planta são complementares para explicar quando a planta disponibiliza néctar via NEFs para as formigas mutualistas: (i) o estágio fenológico da planta (NOGUEIRA *et al.*, 2020; VILELA; TOREZAN-SILINGARDI; DEL-CLARO, 2014) e (ii) a existência de mecanismos de controle na produção de néctar quando o estágio fenológico da planta é favorável a atividade dos NEFs (DÁTTILO *et al.*, 2015; MONDOR; TREMBLAY; MESSING, 2006). O primeiro, mais associado a história de vida e a variação de fatores extrínsecos a planta, como a disponibilidade de recursos ao longo do ano; e o segundo, mais associado a mecanismos intrínsecos da planta na redução de custos no investimento em defesa biótica. É esperado que as plantas secretem mais néctar e se associem com as formigas no período em que estão produzindo novos tecidos vegetais, como novos ramos, folhas e/ou inflorescências (HEIL; MCKEY, 2003; JONES; KOPTUR, 2015). Nesse estágio fenológico, a planta além de ser mais atrativa para as formigas, também pode ser mais atrativa para os herbívoros (COLEY; ENDARA; KURSAR, 2018). Nessa situação, os tecidos jovens, especialmente as folhas produzidas pela planta nesse momento, possuem menor tenacidade, dureza e maiores quantidades de água e nutrientes (COLEY; BATEMAN; KURSAR, 2006). De forma complementar, na existência de custos associados à produção do néctar extrafloral consumido pelas formigas mutualistas, é esperado que na ausência de herbívoros a secreção seja mínima. De forma oposta, durante eventos de herbivoria a secreção de néctar deve se intensificar para que o recrutamento de formigas aumente no momento de maior pressão de herbivoria (KARBAN, 2020). Portanto, é quando a planta está produzindo novos tecidos e

torna-se mais atrativa para os herbívoros que esperamos que o mutualismo de proteção planta-formiga seja funcional, e potencialmente mais benéfico para as plantas.

A importância do néctar como recurso para a comunidade de formigas tem sido confirmada por evidências experimentais (BLÜTHGEN; FIEDLER, 2004b; CALIXTO; LANGE; DEL-CLARO, 2021; SILVA *et al.*, 2019). Por exemplo, a disponibilidade do néctar extrafloral aumenta a sobrevivência e a aptidão das colônias de formigas (BYK; DEL-CLARO, 2011; FLORES-FLORES *et al.*, 2018). No entanto, as espécies de plantas com NEFs diferem muito nas características do néctar extrafloral consumido pelas formigas, especialmente no volume, concentração de açúcar e dinâmica de secreção, uma variação associada pelo menos em parte a diversidade de arranjos morfológicos dos NEFs (DÍAZ-CASTELAZO *et al.*, 2005; MARAZZI *et al.*, 2019). A variação no tamanho e morfologia dos NEFs e de sua atividade secretora podem representar um gradiente de atratividade para a assembleia de formigas (APPLE; FEENER, 2001; BAKER-MÉIO; MARQUIS, 2012; DÍAZ-CASTELAZO *et al.*, 2005). Por outro lado, as formigas podem exibir preferências entre as diferentes fontes de néctar disponíveis no ambiente (APPLE; FEENER, 2001; WILDER; EUBANKS, 2009). Formigas são atraídas mais abundantemente aos NEFs que produzem maiores quantidades de néctar (BAKER-MÉIO; MARQUIS, 2012; CALIXTO *et al.*, 2020) ou, ainda, por volumes de néctar com teores e concentrações de açúcares mais altos (GONZÁLEZ-TEUBER *et al.*, 2012; LANGE; CALIXTO; DEL-CLARO, 2017; SHENOY *et al.*, 2012). Além disso, a hierarquia de dominância entre espécies de formigas desempenha um papel relevante na monopolização de recursos (BLÜTHGEN; FIEDLER, 2004a). Espécies de formigas dominantes ocupam mais frequentemente as fontes de recurso de melhor qualidade (BLÜTHGEN; FIEDLER, 2004a; FAGUNDES *et al.*, 2017; FLORES-FLORES *et al.*, 2018), podendo deslocar espécies de formigas subordinadas para recursos de pior qualidade (RIBEIRO *et al.*, 2019). As formigas dominantes ao monopolizarem os melhores recursos também otimizam o serviço de proteção em decorrência de sua maior agressividade (FAGUNDES *et al.*, 2017). Dessa forma, é esperado que plantas que secretem um maior volume de néctar mais concentrado e com maior quantidade de açúcares represente uma fonte de recursos mais atrativa para as formigas, especialmente as formigas dominantes, podendo aumentar a sua frequência de visitas e abundância total de operárias nas plantas.

Poucos trabalhos buscaram investigar o papel das diferenças interespecíficas nas características dos NEFs e do néctar extrafloral sobre a atratividade de formigas potencialmente defensoras em plantas com NEFs (por exemplo: APPLE; FEENER, 2001; BAKER-MÉIO; MARQUIS, 2012). A vasta maioria dos trabalhos relatam variações na composição e atividade

de formigas dentro de uma única espécie vegetal portadora de NEFs (BENTLEY, 1977; CRUZ *et al.*, 2018; RIOS; MARQUIS; FLUNKER, 2008; SHENOY *et al.*, 2012). A escassez de informações resultante dessa limitação compromete nosso entendimento sobre os efeitos das diferenças estruturais dos NEFs e do néctar extrafloral na capacidade relativa das plantas em atrair parceiros mutualistas em uma comunidade rica em espécies de plantas com NEFs. A ocorrência de resposta à danos como mecanismo induzível entre espécies vegetais simpátricas com NEFs morfologicamente distintos também não foi determinada. Embora as plantas com NEFs sejam amplamente distribuídas e constantemente estudadas (MARAZZI; BRONSTEIN; KOPTUR, 2013), nenhum estudo abordou, conjuntamente, as variações dos NEFs e do néctar secretado entre espécies de plantas que interagem com a mesma assembleia de formigas. A natureza induzível do néctar extrafloral como mecanismo de controle da interação, de acordo com a pressão de herbivoria, entre espécies tampouco foi estudado.

Espécies do gênero *Chamaecrista* Moench (Leguminosae – Caesalpinioideae) possuem diferenças no tamanho e na estrutura dos NEFs de suas folhas, assim como no conteúdo do néctar extrafloral secretado (BAKER-MÉIO; MARQUIS, 2012; COUTINHO; MEIRA, 2015). Essas diferenças interespecíficas nos NEFs podem modificar a atratividade das plantas para formigas, o padrão de resposta das plantas aos herbívoros e, por consequência, a aptidão das plantas, especialmente quando essas espécies de plantas ocorrem em uma mesma localidade e interagem com a mesma assembleia de formigas e herbívoros. Neste trabalho, nós investigamos o mutualismo de proteção planta-formiga em três espécies anuais de *Chamaecrista* distribuídas no domínio fitogeográfico da Caatinga, no qual cada espécie tem NEFs peciolares com tamanhos distintos. As três espécies de *Chamaecrista* devem representar um gradiente de disponibilidade de recursos alimentares via NEFs para a assembleia de formigas locais. Para testar essa premissa inicial do trabalho, nós inicialmente investigamos se a espécie com NEFs maiores disponibiliza o maior volume, concentração e quantidade de açúcares no néctar para a assembleia de formigas. Esperamos que a espécie de planta com NEFs maiores secretem uma quantidade maior de néctar mais concentrado e com uma maior quantidade de açúcares. As três espécies de *Chamaecrista* também devem aumentar a produção de néctar via mecanismo de indução após eventos de herbivoria. Para testar essa hipótese, nós investigamos experimentalmente no campo o mecanismo de indução de secreção de néctar após o dano foliar nas três espécies de *Chamaecrista*. Esperamos que a espécie com NEFs maiores responda mais intensamente a herbivoria foliar pelo aumento da produção de néctar mais concentrado e com maior quantidade de açúcares. Consequentemente, uma maior riqueza e abundância de operárias deve estar associada a espécie de planta com NEFs maiores que

produzem néctar em maior quantidade e qualidade. Ademais, como espécies diferentes de formigas consomem néctar extrafloral e as espécies dominantes acessam principalmente as fontes de alta qualidade disponíveis, a ocorrência/diversidade de dominantes também deve ser maior na espécie com NEFs mais atrativos. Para testar essa hipótese, nós investigamos como a atratividade dos NEFs está relacionada com o padrão de visitação de formigas. Esperamos que a espécie de planta com NEFs maiores e mais produtivos atraia uma maior diversidade (riqueza e número de operárias) de formigas, além de espécies numericamente dominantes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo e espécies vegetais focais

A pesquisa foi conduzida em uma área de floresta tropical sazonalmente seca no domínio fitogeográfico da Caatinga, na Fazenda Experimental Vale do Curu (3°48' 43" S 39°20' 42" W; 80 m), município de Pentecoste, estado do Ceará, Brasil (Fig. 1A-D). De acordo com a classificação de Köppen, o clima é semiárido (BSh) com temperaturas médias anuais variando de 25°C a 30°C e precipitação média anual em torno de 800 mm com chuvas irregulares de fevereiro a maio (ALVARES *et al.*, 2013; ARAÚJO *et al.*, 2014; PINA *et al.*, 2016). A vegetação local é do tipo Caatinga arbustiva densa e solos neossolos flúvicos de textura franca (ARAÚJO *et al.*, 2014; IPECE, 2009).

Para este trabalho, selecionamos três espécies anuais de *Chamaecrista* nativas do semiárido nordestino brasileiro: *Chamaecrista diphylla* (L.) (Fig. 1I-L); *Chamaecrista duckeana* (P. Bezerra & Afr. Fern.) H.S.Irwin & Barneby (Fig. 1M-R) e *Chamaecrista calycioides* (DC. ex Collad.) Greene (Fig. 1E-H). No geral, as três espécies são subarbustos (~20 a 60 cm) com flores isoladas reunidas em 1-3 pequenos racemos floridos comumente visitados por abelhas que vibram as anteras e atuam como polinizadores. Possuem frutos lineares e enrolados quando abertos e dispersão explosiva (QUEIROZ; LOIOLA, 2009; SILVA; ROCHA; SANTOS, 2014). Em particular, a espécie *Chamaecrista diphylla* possui ampla distribuição e ocorre nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste (FLORA DO BRASIL, 2020). Essa espécie possui um par de folíolos, variando de obliquamente obovado ou suborbicular a estreitamente oblanceolado, linear ou linear-elíptico com 14-22 × 8-14 mm, estípulas lanceoladas longas com 9-25 mm e pecíolo com um-dois nectários extraflorais sésseis ou ligeiramente estipitados (IRWIN; BARNEBY, 1982; QUEIROZ; LOIOLA, 2009). Já a espécie *Chamaecrista duckeana* ocorre somente na região Nordeste, nos estados do Ceará (FLORA DO BRASIL, 2020) e Pernambuco (MATOS; MELO; SANTOS-SILVA, 2019), e é

uma espécie paripinada com 14-24 pares de folíolos, variando de linear-oblongo agudo ou subobtus mucronulado com 8-20 x 3-4 mm, estípulas estreitamente triangulares à lanceoladas com 8-17 mm de comprimento e pecíolo com um-dois nectários extraflorais estipitados (IRWIN; BARNEBY, 1982; MATOS; MELO; SANTOS-SILVA, 2019). A espécie *Chamaecrista calycioides* ocorre nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste e é uma espécie paripinada com 5-12 pares de folíolos variando de oval a lanceolado mucronulado com 5-13 x 0.7-2.3 mm, estípulas lanceoladas com 2-7.5 mm e pecíolo com um-dois nectários extraflorais estipitados (QUEIROZ; LOIOLA, 2009).

Desde o final da estação seca e início da estação chuvosa, fizemos buscas ativas das plantas no campo e observamos que as três espécies de *Chamaecrista* germinam cerca de três semanas após o início das chuvas na região. Portanto, as plantas em início de desenvolvimento foram observadas a partir de fevereiro de 2020. Já a floração ocorreu a partir do mês de abril, com a produção de frutos maduros dispersando sementes a partir do mês de maio de 2020. Nos locais de amostragem, as populações de *C. diphylla* e *C. calycioides* ocorrem densamente em ambientes abertos. Por outro lado, as populações de *C. duckeana* ocorrem principalmente sob a vegetação de maior porte, podendo estar parcialmente sombreadas, ocorrendo de forma menos adensada que as outras duas espécies de *Chamaecrista*.

Delineamento amostral

Em março de 2020 começamos a marcação dos indivíduos das três espécies no campo, totalizando 90 plantas (30 indivíduos por espécie) marcadas aleatoriamente na paisagem. Considerando que as espécies selecionadas são anuais, estando disponíveis em campo somente na estação chuvosa, toda amostragem envolvendo as coletas de NEFs, atividade secretora dos NEFs sob condições de campo e sob manipulação após eventos de herbivoria simulados, e visitação de formigas ocorreram de março a maio de 2020. Em junho, a maioria das plantas já estavam produzindo muitas flores e frutos, com poucas folhas secretando néctar extrafloral.

Os 90 indivíduos foram marcados na paisagem em uma área total de 250.000 m² dentro da área de estudo. Cada indivíduo marcado esteve a uma distância mínima de 10 metros uns dos outros (NOGUEIRA; REY; LOHMANN, 2012), com o intuito de assegurar a independência espacial entre plantas e aumentar a chance de que as formigas visitantes pertencessem a diferentes colônias. Em nenhuma das plantas marcadas no campo detectamos a presença de hemípteros produzindo melada (*honeydew*) que também poderiam atrair formigas

(BLÜTHGEN; MEZGER; LINSENMAIR, 2006) e confundir nossos resultados pela disponibilidade de fontes alternativas de secreções açucaradas.

Variação do tamanho dos NEFs e dos descritores do néctar extrafloral entre as espécies de Chamaecrista

Para investigar a premissa de que espécies com NEFs maiores secretam mais néctar e com maior concentração e quantidade de açúcares, nós medimos o tamanho dos NEFs e as características do néctar nas 30 plantas de cada espécie de *Chamaecrista* distribuídas no campo. Para quantificar o número de folhas com os NEFs ativos por planta, nós inicialmente retiramos todas as formigas e outros insetos que eventualmente estivessem escondidos nas folhas, às 17h. Subsequentemente, nós aplicamos uma resina pegajosa não tóxica (*tanglefoot*) sobre uma fita crepe fixada na base do caule das plantas que atuou como barreira de exclusão de novas formigas visitantes. Sempre que necessário, nós também retiramos ramos ou folhas de outras plantas vizinhas que tocavam as plantas focais e poderiam permitir que as formigas acessassem os NEFs. Na manhã do dia seguinte, por volta das 5:30h, nós quantificamos o número total de folhas da planta e o número de folhas com gotas ou brilho de néctar extrafloral acumulado nos NEFs. Utilizamos essa primeira estratégia de amostragem para quantificar as folhas cujos NEFs secretavam néctar nas 90 plantas focais.

Na etapa seguinte, realizamos medidas detalhadas do volume e concentração de açúcares do néctar extrafloral em 45 das 90 plantas focais (15 indivíduos de cada espécie). Como realizado anteriormente, as plantas foram limpas de formigas e insetos e a resina pegajosa não tóxica (*tanglefoot*) foi reaplicada na base do caule, a fim de garantir a exclusão total de formigas. Em seguida, as plantas foram ensacadas com sacos plásticos transparentes que impediram o acesso e o consumo do néctar por forrageadores alados, bem como a remoção da secreção pela chuva ou orvalho. Por se tratar de NEFs diminutos, cuja secreção acumula baixos volumes de néctar em condições de campo, o ensacamento das plantas permitiu que o néctar extrafloral fosse secretado e acumulado durante a noite minimizando as perdas de néctar via evaporação.

Na manhã seguinte, a partir das 5:30h, o néctar total acumulado por folha foi coletado com auxílio de tubos capilares de 1 μ l (Blaubrand® ou Drummond Microcaps®). Nós utilizamos um microcapilar diferente por folha para evitar o entupimento dos capilares a cada coleta. Coletamos o néctar de todas as folhas cujos NEFs formaram gotas. Quando as folhas tinham mais de um NEF (máximo de dois por folha), o néctar de ambos foi considerado em conjunto (néctar total da folha). Entretanto, a maioria das folhas portava um único NEF. Para

determinar o volume do néctar, quantificamos a extensão do microcapilar preenchida pelo néctar com um paquímetro digital (Sylvac IP67 digital Caliper S_Cal EVO) e, posteriormente, os valores foram convertidos em microlitros. A concentração total de açúcares do néctar foi medida com auxílio de um refratômetro portátil modelo *Eclipse low volume* (Bellingham + Stanley™), indicado para a quantificação da concentração de solutos em amostras de volume reduzido. O volume de néctar secretado por todas as folhas de uma mesma planta foi transferido para a superfície de prisma do refratômetro, no qual realizamos a leitura da concentração de açúcares (% em *Brix*). Concomitantemente, foi registrada a temperatura ambiente e a umidade relativa do ar durante a amostragem de cada planta. Dado que o refratômetro está calibrado para estimar a concentração de açúcar a uma temperatura de 20°C e a faixa das temperaturas no campo variou de 21,6°C a 32,5°C durante a amostragem, corrigimos os valores de concentração de açúcares do néctar utilizando a tabela de correção fornecida pelo fabricante do refratômetro. Quando o volume do néctar produzido pelo conjunto de NEFs de uma planta era muito baixo (< 0.5 µl), não foi possível medir a concentração de açúcares dessa planta. Em tais casos, somente o volume foi registrado. A partir das medidas de volume (µl) e da concentração de açúcares (% *Brix*) do néctar, calculamos a massa total de açúcares (mg) utilizando a equação descrita em Dafni, Kevan & Husband (2005). O volume e massa total de açúcares foram determinados na escala da folha individual (µl/folha e mg/folha).

Ao final do trabalho em campo, coletamos uma folha totalmente expandida de 83 das 90 plantas focais inicialmente marcadas e quantificamos em laboratório as medidas de tamanho dos NEFs (área total, área secretora e secções dessas áreas). Inicialmente, fotografamos a vista superior dos NEFs em um estereomicroscópio Nikon SMZ 1500 (Tokyo, Japan) equipado com uma câmera digital Nikon DS-Fi1, cuja escala de tamanho foi padronizada em 100 µm para todas as imagens dos NEFs. Em seguida, foram tomadas medidas da área total da região superior dos NEFs bem como da área secretora central e das secções longitudinal e transversal, em relação ao pecíolo, utilizando o software ImageJ versão 1.53e. Medimos ao todo quatro secções: duas internas (referentes à área secretora) e duas externas (referentes à área total). Durante as medidas, o software ImageJ foi calibrado de acordo com a escala das imagens (100 µm). Os valores referentes as medidas de área total e área secretora foram determinados em µm² e, juntamente com as medidas das secções, posteriormente convertidos em mm.

Experimento de simulação de herbivoria e resposta induzida na secreção de néctar extrafloral

Para investigar se a secreção de néctar pode ser intensificada após eventos de herbivoria e se a espécie com maiores NEFs possui a maior intensidade de resposta, como propusemos em nossas hipóteses, realizamos um experimento simulando a herbivoria foliar nas mesmas 45 plantas utilizadas anteriormente, sendo 15 plantas de cada uma das três espécies de *Chamaecrista*. Para isso, nós comparamos a secreção do néctar extrafloral previamente amostrado sob condições naturais de campo antes da simulação de herbivoria, com uma nova medida da secreção imediatamente após a simulação da herbivoria. O tratamento experimental de simulação da herbivoria foliar consistiu na remoção de 20% da área foliar em metade das folhas de cada planta. A herbivoria de 20% se baseou em observações prévias do percentual de herbivoria foliar, em condições naturais, em todas as plantas focais distribuídas no campo. Após a aplicação do dano foliar (17h-18h), as plantas foram novamente isoladas com resina não tóxica (*tanglefoot*) e finalmente ensacadas. No dia seguinte pela manhã (6h às 10h), as medidas de volume e concentração de açúcares foram novamente aferidas, conforme descrito anteriormente. Para as comparações dos descritores do néctar antes e depois da simulação da herbivoria, nós padronizamos as medidas de volume e massa total de açúcares na escala da planta ($\mu\text{l/planta}$ e mg/planta).

Visitação dos NEFs pelas formigas

Os censos de formigas foram realizados nas 90 plantas em quatro momentos distintos, nos meses de abril e maio. Para evitar interferências na visitação das formigas, os dois primeiros censos antecederam a coleta de néctar extrafloral. Esse cuidado foi necessário porque o procedimento inicial para averiguar a atividade secretora dos NEFs envolveu o ensacamento das 90 plantas focais, e a remoção de partes das plantas vizinhas que poderiam atuar como pontes para o forrageamento das formigas. Nós também realizamos dois censos das formigas posteriores às medidas de néctar. O objetivo dessas observações adicionais foi ampliar a nossa capacidade de detectar espécies da assembleia de formigas que visitam os NEFs das plantas focais. Em cada censo, ao chegar nas plantas, realizamos uma primeira inspeção visual à uma distância de 1 metro, quantificando o número de operárias recrutadas e eventuais herbívoros presentes na planta. Após essa contagem, realizamos a coleta dos diferentes morfotipos de formigas nas plantas. Para isso, a planta foi agitada cuidadosamente sobre uma bandeja contendo água, onde todas as formigas caíram. As formigas foram então transferidas para microtubos do tipo *ependorf* contendo álcool 90% para posterior identificação. Cada

microtubo foi etiquetado com informações de data, período do dia e identidade/número da planta.

No primeiro censo, foram realizadas seis rodadas de observação em cada planta no período da manhã e três no período da tarde, a fim de evitar falsas ausências na detecção das formigas em cada planta. Para isso, após realizar amostragens no conjunto de plantas (8-12 plantas por dia), retornávamos para a primeira planta amostrada daquele dia e tomávamos novamente todos os dados da visita das formigas. Estabelecemos um intervalo de 5 minutos entre as rodadas de observação das formigas realizadas no mesmo dia. Já no segundo censo, realizamos uma única observação e coleta das formigas por planta (90 plantas no dia). No terceiro censo realizamos três observações e coletas em cada planta (20-25 plantas por dia) no período da manhã e duas no período da tarde. No último e quarto censo, repetimos os procedimentos no período da manhã com repetição à tarde como realizado no primeiro censo. As observações e coletas das formigas ocorreram sempre entre as 06h e 10h da manhã, e no período vespertino entre as 16h e 18h. Esse procedimento foi adotado porque algumas espécies de formigas forrageadoras de néctar mostram um padrão de atividade bimodal, patrulhando pela manhã e à tarde em temperaturas de 32°C ou menos (DOWD, 1979; LIMA; ANTONIALLI-JUNIOR, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 1999; VIEIRA; FERNANDES; ANTONIALLI-JUNIOR, 2012).

Após a identificação das espécies de formigas em laboratório, categorizamos as espécies de formigas entre espécies numericamente dominantes ou subordinadas. Para essa classificação, consideramos a frequência relativa de operárias de cada espécie (razão entre a frequência absoluta e o número total de plantas amostradas), conforme Lach, Parr & Abbott (2010), em todas as plantas amostradas ($n = 90$) e depois nas plantas de cada espécie de *Chamaecrista* ($n = 30$).

Análises dos dados

Inicialmente testamos se existe diferença nos descritores do tamanho dos NEFs e do néctar extrafloral entre as espécies de *Chamaecrista*. Para isso, construímos modelos lineares (LMs) em que cada descritor do tamanho dos NEFs e do néctar extrafloral foram as variáveis dependentes e as espécies o fator categórico. Nesses casos, utilizamos a distribuição probabilística gaussiana para explicar a variabilidade dos dados. Na sequência, utilizamos o teste a posteriori de Tukey para analisar as diferenças entre as três espécies vegetais nos descritores de tamanho dos NEFs e do néctar extrafloral.

No experimento de simulação de herbivoria, nós testamos se a produção do néctar extrafloral é intensificada após eventos recentes de herbivoria e se as espécies com NEFs maiores têm maior controle na atividade secretora. Para isso, nós utilizamos três modelos lineares mistos (LMMs) com distribuição probabilística gaussiana, um modelo para cada variável resposta descrevendo o néctar extrafloral. Para cada modelo, as variáveis dependentes foram o volume do néctar por planta, concentração de açúcares e massa total de açúcares por planta. Os fatores fixos foram as variáveis categóricas herbivoria (antes e depois da herbivoria) e espécie de planta (três espécies de *Chamaecrista*). Visto que cada planta focal foi mensurada duas vezes (antes e depois da herbivoria simulada) e espera-se que medidas na mesma planta sejam mais semelhantes que medidas em plantas diferentes, a identidade da planta foi incluída nos modelos como uma variável randômica. Posteriormente, fizemos uma análise comparando as diferenças nos descritores do néctar antes e depois da herbivoria simulada dentro cada espécie de planta. Para isso, testamos individualmente a hipótese associada à cada espécie (três testes considerando as três espécies), aplicando a correção de Bonferroni (nível de significância $\alpha = 0.05/3 \text{ testes} = 0.016$). Nos casos em que a distribuição dos dados e resíduos se comportou de forma assimétrica, aplicamos uma transformação nos dados originais (raiz quadrada ou logarítmica).

Para avaliar se o padrão de visitação das operárias de formigas é diferente entre as espécies de *Chamaecrista*, construímos modelos lineares mistos generalizados (GLMMs). Nesses modelos, a variável dependente foi o número total de operárias por planta em cada observação e o fator categórico fixo foi espécie de planta. Dado que as variáveis resposta são do tipo contagem e não possuem variância constante nem distribuição normal, utilizamos a distribuição probabilística binomial negativa em virtude da grande quantidade de valores próximos ou iguais a zero. Como foram realizadas múltiplas observações nas mesmas plantas focais em diferentes dias e horários, incorporamos nos modelos as variáveis randômicas (i) identidade da planta e (ii) período do dia aninhado dentro do dia de coleta. Além disso, analisamos se o número máximo de operárias das formigas por planta focal variou entre as espécies vegetais, utilizando os mesmos modelos anteriores com modificações. Para essa análise, não incluímos fatores randômicos, pois o número máximo de formigas em cada planta foi uma única observação no tempo. Nesse teste, portanto, não tivemos medidas repetidas de formigas por planta. Subsequentemente, investigamos somente o padrão de visitação de formigas numericamente dominantes nas três espécies de *Chamaecrista*. Para isso, utilizamos GLMMs em que a variável dependente foi o número total de operárias da espécie dominante por planta e o fator categórico foi a espécie de planta. Utilizamos o mesmo conjunto de fatores

randômicos utilizados nos modelos descritos acima. A variação no número máximo de operárias de formigas numericamente dominantes por planta focal entre as espécies vegetais também foi analisada conforme realizado para o número máximo de formigas. Na sequência, utilizamos o teste a posteriori de Tukey para analisar as diferenças entre as três espécies vegetais no número total e número máximo de operárias de formigas e formigas dominantes.

Os pressupostos de normalidade das variáveis resposta, resíduos e homogeneidade de variâncias foram considerados em todas as análises. Realizamos análises gráficas visuais dos resíduos como ferramenta de análise exploratória dos dados e avaliação dos pressupostos. Para a execução de todas as análises estatísticas e confecção dos gráficos, foi utilizado o software RStudio versão 1.3.959 (RSTUDIO CORE TEAM, 2020) e pacotes adicionais glmmADMB (SKAUG *et al.*, 2018) e Yarr (PHILLIPS, 2017).

4 RESULTADOS

Variação do tamanho dos NEFs e dos descritores do néctar extrafloral entre as espécies de Chamaecrista

O tamanho dos NEFs diferiu entre as espécies de *Chamaecrista* (Tabela 1), independentemente dos descritores de tamanho utilizados (área total, área secretora e secções dos NEFs). *Chamaecrista duckeana* possui os NEFs com maior tamanho, enquanto os NEFs de *C. calycioides* e *C. diphylla* têm o menor tamanho considerando as diferentes métricas utilizadas (Tabela 1; Material suplementar S1 Fig. 1). A área secretora dos NEFs de *C. duckeana* teve em média $0.14 \text{ mm}^2 \pm 0.07$ (média \pm desvio padrão) e foi cerca de 4,6 vezes maior do que a área secretora dos NEFs de *C. calycioides*, e 14 vezes maior que a área secretora dos NEFs de *C. diphylla* (Fig. 2A).

Em média, a proporção de folhas com NEFs ativos não diferiu entre as espécies (Tabela 01; S2 Fig. 2). Já o volume do néctar extrafloral secretado ($\mu\text{l}/\text{folha}$), assim como a concentração de açúcares (% *Brix*) e a massa total de açúcares (mg/folha) foi diferente entre as três espécies de *Chamaecrista* (Tabela 1). O volume médio de néctar secretado pelos NEFs de *C. duckeana* foi de $0.09 \mu\text{l}/\text{folha} \pm 0.13$, cerca de 3 vezes maior que o volume secretado pelos NEFs de *C. calycioides* e 9 vezes maior que o volume secretado pelos NEFs de *C. diphylla* (Fig. 2B). A concentração de açúcares do néctar foi em média semelhante em *C. calycioides* e *C. duckeana*, e ambas tiveram concentrações duas vezes maiores que *C. diphylla* (Fig. 2C). A massa total de açúcares (mg/folha) do néctar de *C. duckeana* foi de $0.0058 \text{ mg}/\text{folha} \pm 0.0067$,

cerca de 2,7 vezes maior do que o de *C. calycioides* e 11 vezes maior do que o de *C. diphylla* (Fig. 2D).

A herbivoria simulada induz respostas distintas na secreção de néctar extrafloral entre as espécies de Chamaecrista

O efeito da herbivoria sobre o volume do néctar foi dependente da espécie de *Chamaecrista* (interação entre os fatores herbivoria*espécie: $N = 45$; $F_{2,42} = 5.21$; $P = 0.009$). Em média, plantas de *C. duckeana* secretaram 1.46 μl a mais de volume do néctar após a herbivoria foliar comparado com a secreção antes da herbivoria (Fig. 3A). De forma semelhante, as plantas de *C. calycioides* secretaram em média 0.74 μl a mais de volume do néctar após a herbivoria foliar comparado com a secreção antes da herbivoria (Fig. 3A). Já as plantas de *C. diphylla*, com os menores NEFs, secretaram em média a mesma quantidade de néctar extrafloral antes e depois da herbivoria (Fig. 3A).

Ao contrário do que foi observado para o volume, a concentração de açúcares do néctar diferiu entre antes e depois da herbivoria foliar ($N = 45$; $F_{1,21} = 11.4$; $P = 0.002$), mas não diferiu entre espécies ($N = 45$; $F_{2,21} = 1.94$; $P = 0.16$). Também não existiu interação entre os dois fatores ($N = 45$; $F_{2,21} = 0.05$; $P = 0.94$). Em média, plantas de *C. duckeana* secretaram néctar com uma concentração média 1.43% maior após a herbivoria foliar do que antes da herbivoria, semelhante às plantas de *C. calycioides* com cerca de 1.40% maior depois da herbivoria foliar (Fig. 3B). Já as plantas de *C. diphylla* produziram néctar com uma média de concentração 2.03% maior após a herbivoria foliar do que antes da herbivoria (Fig. 3B).

A produção total de açúcares diferiu antes e depois da herbivoria foliar ($N = 45$; $F_{1,21} = 22.2$; $P < 0.001$) e entre espécies ($N = 45$; $F_{2,21} = 36.6$; $P < 0.001$), mas não existiu interação entre os dois fatores ($N = 45$; $F_{2,21} = 2.97$; $P = 0.07$). Embora não tenha existido interação entre os fatores na análise principal, nas análises posteriores o tamanho do efeito da herbivoria foi muito maior em *C. duckeana*, seguida da espécie *C. calycioides*, e, por fim, a espécie *C. diphylla*. Plantas de *C. duckeana* produziram em média 0.093 mg mais açúcares no néctar após a herbivoria do que antes da herbivoria (Fig. 3C). Plantas de *C. calycioides* produziram 0.039 mg mais açúcares no néctar após herbivoria do que antes da herbivoria (Fig. 3C). Finalmente, plantas de *C. diphylla* quase não tiveram diferença no total de açúcares produzidos antes e depois da herbivoria, e produziram apenas 0.003 mg mais açúcar no néctar após herbivoria do que antes da herbivoria (Fig. 3C).

Assembleia de formigas e padrão de dominância numérica das espécies

Ao final de 1365 observações nas 90 plantas focais (~15 observações por planta), detectamos 191 formigas operárias visitando os NEFs, pertencentes a seis gêneros e nove espécies de formigas (S3 Tabela 1). Dentre as nove espécies de formigas, três foram consideradas numericamente dominantes, com base na frequência relativa nas plantas focais: *Camponotus crassus*, *Crematogaster* sp. 1 e *Pheidole* sp. 1 (Fig. 4A). No entanto, as espécies consideradas dominantes estiveram distribuídas de forma desigual entre as três espécies de *Chamaecrista*. Em *C. diphylla* e *C. calycioides*, a espécie de formiga dominante foi *Crematogaster* sp1 (Fig. 4B-C), enquanto em *C. duckeana* foram as espécies *Camponotus crassus* e *Pheidole* sp1 juntas (Fig. 4D).

Diversidade e visitação diferencial de formigas nos NEFs das três espécies de Chamaecrista

O padrão de visitação das formigas não foi o mesmo entre as três espécies de *Chamaecrista*. Os NEFs das plantas de *C. duckeana* foram visitados mais frequentemente pelas formigas (51.8% das visitas), e incluiu 8 espécies, seguida pelas plantas de *C. calycioides* (33% das visitas) com 6 espécies, e plantas de *C. diphylla* (15.2% das visitas) com 3 espécies. Formigas do gênero *Crematogaster* foram as mais abundantes durante as observações, mas foram muito mais frequentes nos NEFs de *C. calycioides* e *C. diphylla*.

O número de formigas operárias por observação diferiu entre as espécies de *Chamaecrista* ($N = 90$; $F_{2,1246} = 21.3$; $P < 0.001$). *C. duckeana* foi a espécie na qual registramos a maior quantidade de formigas operárias em comparação com as outras duas espécies (Fig. 5A). Já as espécies *C. calycioides* e *C. diphylla* não diferiram no número de formigas operárias visitando os NEFs (Fig. 5A). O número máximo de formigas operárias por planta diferiu entre as espécies de *Chamaecrista* ($N = 90$; $F_{2,87} = 5.70$; $P = 0.004$). Plantas de *C. duckeana* tiveram o maior número máximo de formigas por planta, diferindo das demais espécies (Fig. 5B). Em contrapartida, não houve diferença na quantidade máxima de formigas operárias por planta entre *C. calycioides* e *C. diphylla* (Fig. 5B).

Quando consideramos somente as espécies de formigas numericamente dominantes, o padrão de visitação diferiu entre as três espécies de *Chamaecrista*. O número de formigas operárias de *Camponotus crassus* por observação diferiu entre as espécies de planta ($N = 90$; $F_{2,1247} = 17.5$; $P < 0.001$), sendo mais alto em plantas de *C. duckeana* (Fig. 5C). De forma semelhante, o número máximo de operárias de *Camponotus crassus* por planta também foi mais alto em *C. duckeana* ($N = 90$; $F_{2,87} = 12.6$; $P < 0.001$; Fig. 5D). O número de formigas operárias de *Pheidole* sp.1 por planta diferiu entre as espécies de *Chamaecrista* ($N = 90$; $F_{2,1247}$

= 38.4; $P < 0.001$), sendo mais alto em *C. duckeana* (Fig. 5E). Do mesmo modo, o número máximo de operárias de *Pheidole* sp.1 por planta foi maior em *C. duckeana* ($N = 90$; $F_{2,87} = 52.1$; $P < 0.001$; Fig. 5F). O número de formigas operárias de *Crematogaster* sp.1 por observação não diferiu entre as espécies ($N = 90$; $F_{2,1247} = 0.76$; $P = 0.46$; Fig. 5G), assim como o número máximo de operárias de *Crematogaster* sp.1 por planta ($N = 90$; $F_{2,87} = 2.69$; $P = 0.07$; Fig. 5H).

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho investigamos como um mutualismo planta-formiga é regulado em três espécies simpátricas de *Chamaecrista* portadoras de NEFs com diferentes tamanhos na Caatinga brasileira. Para isso, avaliamos como a produção de néctar extrafloral varia em quantidade (volume) e qualidade (concentração e massa total de açúcares) sob condições de campo e experimentalmente após eventos de herbivoria simulada. Ademais, avaliamos se o padrão de visitação de formigas está relacionado com o tamanho e grau de atratividade dos NEFs das três espécies de *Chamaecrista*. Conforme prevíamos, a produção de néctar extrafloral (volume, concentração e massa total de açúcares) é maior em plantas de *C. duckeana* com NEFs de maior tamanho, e a herbivoria gera uma resposta induzida mais intensa nessa espécie do que nas demais espécies de *Chamaecrista*. Esse padrão de resposta das plantas em *C. duckeana* com maiores NEFs evidencia um controle maior das plantas dessa espécie sobre a atividade secretora dos NEFs. Finalmente, em conformidade com as nossas hipóteses, *C. duckeana* foi a espécie mais atrativa para as formigas da assembleia local, incluindo as espécies numericamente dominantes e potencialmente mais protetoras para as plantas.

Nectários extraflorais maiores produzem néctar em maior quantidade e qualidade

Nossos resultados revelam que a variação no tamanho dos NEFs das plantas resultou em diferenças de volume de néctar entre as três espécies de *Chamaecrista*, com maiores quantidades atribuídas a espécie *C. duckeana*, que possui os NEFs de tamanho maior. Esse resultado corrobora estudos prévios envolvendo três variedades simpátricas de *Chamaecrista desvauxii* (BAKER-MÉIO; MARQUIS, 2012), assim como espécies de outras famílias botânicas (APPLE; FEENER, 2001; RUDGERS, 2004). O tamanho e a morfologia dos NEFs influenciam diretamente na proporção de área secretora na epiderme, bem como a densidade de tecido nectarífero e a sua vascularização, os quais em conjunto determinam as taxas de secreção de néctar (DÍAZ-CASTELAZO *et al.*, 2005; NICOLSON; NEPI; PACINI, 2007). Ainda, os NEFs das plantas sob estudo são estipitados e com superfícies secretoras

côncavas. Tal conformação estrutural parece ser mais funcional, dado que o néctar pode se acumular na concavidade secretora dos NEFs ao invés de escorrer (COUTINHO; MEIRA, 2015; COUTINHO; VALENTE; MEIRA, 2010), aumentando o volume de néctar prontamente disponível para os consumidores. Desse modo, o tamanho dos NEFs torna-se um traço importante uma vez que plantas com NEFs maiores produzem mais néctar (RUDGERS, 2004), o que possibilitaria a atração de um número maior de parceiros mutualistas.

Os NEFs variam em tamanho, estrutura e morfologia mesmo entre espécies de planta filogeneticamente próximas (APPLE; FEENER, 2001; COUTINHO; MEIRA, 2015; MARAZZI *et al.*, 2019) ou entre plantas da mesma espécie (RIOS; MARQUIS; FLUNKER, 2008). Tal variação pode estar relacionada à herdabilidade genética (RUDGERS, 2004) ou mesmo à fatores bióticos como a ação de herbívoros sobre as plantas (RIOS; MARQUIS; FLUNKER, 2008). A variação fenotípica relacionada ao tamanho dos NEFs e qualidade do néctar indica que a evolução diferencial de características dos NEFs entre populações pode ser direcionada principalmente por diferenças populacionais na pressão exercida pelos herbívoros (Rios, Marquis, & Flunker, 2008).

A qualidade do néctar extrafloral das plantas sob condições de campo também foi diferente entre as três espécies. A concentração e a massa total de açúcares do néctar foram maiores nas espécies com NEFs de tamanho maior e intermediário. *Chamaecrista duckeana* e *C. calycioides* tiveram as maiores concentrações e massa total de açúcares no néctar extrafloral em relação a *C. diphylla*. Nesse caso, o tamanho diferencial dos NEFs das três espécies também parece influenciar o componente qualitativo do néctar extrafloral, como observado para o volume, ainda que essa relação (tamanho do NEF \times qualidade do néctar) não seja totalmente direta (NICOLSON; NEPI; PACINI, 2007). Os carboidratos representam os solutos dominantes do néctar extrafloral (HEIL, 2011), sendo a principal fonte de açúcares para parceiros mutualistas como as formigas (ROY *et al.*, 2017). Nesse sentido, o componente qualitativo do néctar está diretamente relacionado com as demandas nutricionais e fisiológicas dos consumidores mutualistas (BLÜTHGEN; FIEDLER, 2004b; BYK; DEL-CLARO, 2011; CALIXTO; LANGE; DEL-CLARO, 2021). Portanto, a relação direta entre composição de açúcares do néctar e demanda dos consumidores explica as diferenças observadas na atração de parceiros entre plantas que variam na atratividade de seus NEFs (BLÜTHGEN; GOTTSBERGER; FIEDLER, 2004; LANGE; CALIXTO; DEL-CLARO, 2017).

Variação interespecífica da resposta induzida pela herbivoria na secreção de néctar extrafloral

No experimento que testou se a secreção de néctar extrafloral pode ser intensificada após eventos de herbivoria, as três espécies tiveram respostas diferentes ao dano. A maioria das plantas submetidas a herbivoria foliar simulada aumentou a produtividade dos seus NEFs pelo menos para algum descritor do néctar extrafloral, corroborando nossas previsões. Quanto maior o tamanho dos NEFs, maior foi a resposta no volume e massa total de açúcares da secreção ao considerarmos as três espécies. Quanto à concentração de açúcares do néctar (% *Brix*), também observamos um aumento moderado após o tratamento de herbivoria, embora semelhante entre as espécies e não relacionado com o tamanho dos NEFs. Esses resultados evidenciam a existência de resposta induzida após a ocorrência da herbivoria foliar nas plantas sob estudo. Mais especificamente, o aumento mais intenso em todos os descritores do néctar nas plantas de *C. duckeana*, a espécie com NEFs maiores, demonstra que essa espécie controla mais eficientemente a produção desse recurso, com uma eminente sensibilidade diante da ocorrência de herbivoria. Essa capacidade tem o potencial de proporcionar uma proteção mais efetiva contra herbívoros, além de otimizar o uso de recursos para defesa nessa espécie, como sugerido para outras espécies (BIXENMANN; COLEY; KURSAR, 2011; CHAMBERLAIN; NATHANIEL HOLLAND, 2009).

Em contraste, *C. diphylla* com os menores NEFs não expressou resposta induzida ao dano. Uma explicação alternativa para a resposta diferencial das espécies frente a herbivoria foliar poderia estar relacionada ao nível do dano infligido. Sabe-se que a magnitude da resposta induzida também depende do tipo e nível de dano infligido nas plantas (CALIXTO *et al.*, 2020; PULICE; PACKER, 2008). Portanto, plantas de *C. diphylla* poderiam somente ser estimuladas após eventos de herbivoria ainda mais intensos. No entanto, a concentração de açúcares nas plantas de *C. diphylla* aumentou consideravelmente após o dano, e os níveis de herbivoria aplicados foram semelhantes aos observados nessa espécie em campo. Cabe ressaltar que na espécie *C. diphylla* conseguimos tomar medidas de concentração do néctar em apenas 5 e 9 plantas focais antes e depois da herbivoria (40% das plantas), respectivamente, dado o volume reduzido de néctar secretado na maioria das plantas. Assim, nossas estimativas da concentração de néctar para *C. diphylla* antes e depois da herbivoria podem ser menos realistas que as estimativas das outras espécies. Realmente, apenas duas plantas elevaram a média de concentração dessa espécie após o tratamento de herbivoria. Aumentos na produtividade dos NEFs foliares em resposta a danos naturais ou simulados foram demonstrados em outros trabalhos (AGRAWAL; RUTTER, 1998; CALIXTO *et al.*, 2020; HEIL *et al.*, 2001b; NESS,

2003), evidenciando que a resposta induzida representa um fenômeno relativamente comum na natureza.

O aumento da produção do néctar extrafloral induzido por eventos de herbivoria foliar são consistentes com as previsões da teoria da defesa ótima (TDO), segundo a qual as defesas das plantas são caras e, portanto, devem ser alocadas em órgãos ou estágios de desenvolvimento de acordo com o valor adaptativo e a probabilidade de ataque (MCKEY, 1974; RHOADES, 1979). A TDO prevê, ainda, que se as defesas forem caras e esporadicamente desnecessárias, as defesas induzidas devem ser favorecidas sobre as defesas constitutivas (KARBAN, 2020). Consistente com essa teoria, as plantas podem minimizar os custos de investimento em defesas por meio da produção induzida de néctar extrafloral (BIXENMANN; COLEY; KURSAR, 2011; HOLLAND; CHAMBERLAIN; HORN, 2009). O controle da atividade dos NEFs pode ser modulado conforme o contexto ecológico e responder a fatores bióticos (e.g. herbivoria) e abióticos, como restrição hídrica (RIOS; MARQUIS; FLUNKER, 2008; ROCHA *et al.*, 2019). Para as espécies estudadas não ocorreu restrição hídrica, e o controle sobre a dinâmica de secreção e produtividade dos NEFs nas três espécies focais foi devida a resposta à herbivoria. Durante nossas observações em campo, não encontramos uma grande quantidade de insetos potencialmente herbívoros nas plantas focais (ALENCAR C. L. S. observações pessoais). Nesse sentido, a herbivoria nessas plantas pode ser esporádica e imprevisível, o que pode explicar mecanismos de aumento da produtividade dos NEFs somente quando são infligidos danos a tecidos recém produzidos e vulneráveis das plantas. Tal mecanismo de controle pode ter sido otimizado ao longo do tempo evolutivo, maximizando os benefícios e diminuindo custos da interação multitróficas planta-formiga-herbívoro (KARBAN, 2020).

Embora a produção de néctar extrafloral nas espécies estudadas pareça ser contínua e os custos de sua produção sejam considerados mínimos (KATAYAMA; SUZUKI, 2011), existe uma lacuna na quantificação direta desses custos nas plantas. Em contrapartida, os mecanismos de indução da secreção quando as plantas estão sob ataque dos herbívoros evidenciam um sistema sincronizado que aumenta os custos de produção do néctar extrafloral quando os benefícios têm maiores chances de serem gerados para as plantas (KARBAN, 2020). Portanto, em um cenário de ausência de herbívoros e parceiros mutualistas conjuntamente com uma produção contínua de néctar, podemos prever custos fisiológicos para as plantas. Em *Chamaecrista fasciculata*, por exemplo, a seleção natural favorece plantas que produzem mais néctar na presença de formigas (RUTTER; RAUSHER, 2004). Consistente com a ideia dos benefícios adaptativos que o néctar extrafloral propicia às plantas na presença de formigas, a

produção de tal recurso na ausência desses parceiros e de herbívoros impõe um custo, ainda que mínimo, às plantas produtoras de néctar (RUTTER; RAUSHER, 2004). Assim, a seleção deverá favorecer a produção de néctar extrafloral sob circunstâncias em que os serviços de proteção das formigas tenham maior valor relativo para as plantas e, dessa forma, os benefícios da produção de defesas pelas plantas excedem os custos.

Diversidade e visitação diferencial das formigas nos NEFs das três espécies de Chamaecrista

O padrão de visitação de formigas variou de acordo com a espécie de *Chamaecrista*. Uma maior diversidade esteve associada às plantas da espécie *C. duckeana*, cujos NEFs são maiores e mais produtivos. Em contrapartida, plantas das espécies *C. calycioides* e *C. diphylla*, cujos NEFs são menores e menos produtivos, suportaram uma diversidade gradativamente menor. Esses dados realçam o gradiente de atratividade que as três espécies constituem no local de estudo. A relação positiva entre o tamanho e a produtividade dos NEFs *versus* atratividade de formigas foi também demonstrada em outros estudos (RIO; MARQUIS; FLUNKER, 2008; BAKER-MÉIO; MARQUIS, 2012), nos quais observou-se que a densidade de formigas foi maior em populações de plantas que portavam os maiores NEFs e apresentavam os maiores volumes e concentrações de açúcares do néctar extrafloral (RIO; MARQUIS; FLUNKER, 2008), e que NEFs maiores produziram mais néctar e sustentaram uma maior riqueza e abundância de formigas (BAKER-MÉIO; MARQUIS, 2012). Portanto, nossos resultados confirmam a importância das diferenças nos atributos dos NEFs e do néctar extrafloral para o estabelecimento das interações planta-formiga. Além disso, o néctar extrafloral é um recurso alimentar primordial para muitas espécies de formigas (BLÜTHGEN; STORK; FIEDLER, 2004; DAVIDSON, 1998; HEIL, 2015), que contribui para aumentos no crescimento, sobrevivência e aptidão das colônias (BYK; DEL-CLARO, 2011; CALIXTO; LANGE; DEL-CLARO, 2021), estruturação espacial das assembleias (Silva, Arnan, Andersen, & Leal, 2019), e, em última instância, para o domínio ecológico das formigas (KAY *et al.*, 2014).

Via de regra, o aumento da disponibilidade de néctar aumenta a riqueza e abundância de formigas sobre as plantas (BELCHIOR; SENDOYA; DEL-CLARO, 2016; GONZÁLEZ-TEUBER *et al.*, 2012; LANGE; CALIXTO; DEL-CLARO, 2017), assim como pode alterar a composição de espécies (RIBEIRO *et al.*, 2018). De fato, a maior produtividade dos NEFs nas plantas de *C. duckeana* resultou em uma maior diversidade e coocorrência de espécies de formigas (8 espécies de formigas do total de 9 espécies registradas). Além disso, plantas de *C. duckeana* e *C. calycioides* secretaram néctar com maior concentração e massa

total de açúcares, atraindo um conjunto mais diversificado de formigas em relação às plantas de *C. diphylla*, que apresentaram baixa produtividade dos NEFs. Plantas que aumentam a produtividade dos seus NEFs geralmente experimentam uma maior diversidade e recrutamento de formigas (BIXENMANN; COLEY; KURSAR, 2011; FAGUNDES *et al.*, 2017; PACELHE *et al.*, 2019). Considerando ainda que as plantas deste estudo ocorrem na mesma área e estão submetidas as mesmas condições ambientais, a variação na diversidade de formigas é principalmente devida as diferenças na produtividade dos NEFs das três espécies.

No contexto dos mutualismos, uma das principais vantagens da interação generalizada com múltiplos parceiros é que diferentes espécies de formigas possuem estratégias e comportamentos diferentes para enfrentar os herbívoros (HEIL, 2008; MILLER, 2007), que podem se complementar e aumentar o sucesso da defesa. A interação com espécies dominantes de formigas, por exemplo, deve ser mais vantajosa para as plantas, pois tais espécies costumam ser mais agressivas em comparação com as subordinadas (ANDERSEN, 1992). A dominância acontece quando uma espécie representa uma grande parcela dos números ou da biomassa da assembleia a qual pertence, podendo ser interpretada de várias maneiras (comportamental, numérica ou ecológica) dependendo do contexto (DAVIDSON, 1998; LACH; PARR; ABBOTT, 2010). Três espécies de formigas numericamente dominantes foram identificadas interagindo com as plantas focais deste estudo. *Crematogaster* sp.1 foi a espécie dominante nas plantas das espécies *C. diphylla* e *C. calyciodes*, enquanto *Camponotus crassus* e *Pheidole* sp.1 foram dominantes nas plantas de *C. duckeana*. Em estudo realizado na Caatinga, espécies congênicas de *Camponotus* e *Pheidole* foram categorizadas como espécies agressivas e, portanto, dominantes comportamentais, enquanto espécies de *Crematogaster* foram classificadas como subordinadas (MELATI; LEAL, 2018). Espécies do gênero *Crematogaster* também foram consideradas dominantes comportamentais em outros sistemas de estudo (PALMER *et al.*, 2008; STUBLE *et al.*, 2017), mas pouco agressivas quando avaliadas na Caatinga (MELATI; LEAL, 2018).

A dominância numérica normalmente se correlaciona com a dominância comportamental em assembleias de formigas (BLÜETHGEN; FIEDLER 2004a; DAVIDSON, 1997). Duas das espécies classificadas como numericamente dominantes nesse estudo tiveram suas congênicas classificadas como dominantes comportamentais em estudo que estimou a agressividade das espécies por meio do compartilhamento de recursos (MELATI; LEAL, 2018). Tal fato nos permite acreditar que as espécies de formigas numericamente dominantes do sistema estudado, especialmente *Camponotus crassus* e *Pheidole* sp.1 dominantes em *C. duckeana*, possivelmente se comportam também como dominantes comportamentais.

Realmente, plantas que fornecem néctar de melhor qualidade concentram mais interações com formigas dominantes que, além da herbivoria, reduzem a frequência de outras espécies de formigas exploradoras (GONZÁLEZ-TEUBER *et al.*, 2012; KOPTUR; JONES; PEÑA, 2015). Assim, plantas de *C. duckeana* podem ter sua proteção particularmente aumentada pela interação mais frequente com espécies dominantes de formigas, enquanto as plantas de *C. diphylla* e *C. calycioides*, que interagiram com uma única espécie dominante, provavelmente são menos protegidas.

Diferenças interespecíficas no tamanho/produzitividade dos NEFs e exclusão por competição podem estar atuando conjuntamente sobre o padrão de visitação das espécies de formigas do sistema, especialmente dominantes. *Crematogaster* sp.1 visita plantas das três espécies de modo mais ou menos igual. No entanto, a frequência relativa de formigas dessa espécie é maior nas plantas de *C. diphylla* e *C. calycioides*. Em *C. duckeana*, por outro lado, *Camponotus Crassus* e *Pheidole* sp1. são mais frequentemente atraídas. Esse padrão pode representar uma relação causal das diferenças de tamanho/produzitividade dos NEFs das três *Chamaecristas* sobre a atratividade de espécies de formigas. Os NEFs maiores em *C. duckeana* fornecem uma recompensa total (quantidade e qualidade do néctar) maior por unidade de planta para as formigas do que NEFs menores de *C. calycioides* e *C. diphylla*. Dessa forma, *C. calycioides* e *C. diphylla* não são atrativas o suficiente para as outras espécies dominantes, devido ao tamanho diminuto e baixa produzitividade de seus NEFs. O oposto foi observado em plantas de *C. duckeana*, a qual atrai mais espécies de formigas incluindo duas espécies dominantes. Ainda, as espécies dominantes desse estudo nunca foram encontradas juntas ou mesmo com outras subordinadas forrageando na mesma planta, o que pode indicar a ocorrência de exclusão competitiva enquanto a dominante estiver na planta. De fato, conforme a abundância de espécies dominantes aumenta na paisagem, é esperado uma redução na abundância de outras espécies via exclusão competitiva (ANDERSEN, 1992; PARR *et al.*, 2005), em razão da alta agressividade dessas dominantes.

Plantas mais atrativas podem estar associadas a formigas numericamente dominantes, maiores e mais agressivas como *Camponotus* e *Pheidole*. Essas espécies possivelmente excluem competitivamente outras formigas subordinadas ou mesmo espécies de *Crematogaster* que, embora frequentes, podem ser menos competitivas frente a outras formigas dominantes. Padrão semelhante foi observado entre populações de *Anemopaegma album* (Bignoniaceae), onde observou-se que populações cujas plantas apresentaram maior abundância de NEFs por folha foram dominadas por *Camponotus* spp., enquanto a população que teve uma menor abundância de NEFs foi dominada por *Crematogaster crinosa*

(NOGUEIRA *et al.*, 2015). No sistema avaliado, portanto, a espécie *Crematogaster* sp.1 é provavelmente deslocada para as plantas que ofertam néctar menos atrativo, enquanto *C. crassus* e *Pheidole* sp.1 dominam as melhores fontes de néctar rico em carboidratos. Os recursos em qualquer sistema natural podem ser particionados em muitas dimensões, dado que a disponibilidade de recursos pode diferir na quantidade, qualidade e distribuição espacial e temporal (BLÜTHGEN; FIEDLER, 2004a; DÁTTILO *et al.*, 2015; HOLLAND; CHAMBERLAIN; HORN, 2010). A partição espacial das fontes de recursos dentro da mesma assembleia de formigas, então, pode ser a chave para a ocorrência e coexistência de uma variedade de espécies nesse sistema (COLEY; ENDARA; KURSAR, 2018).

6 CONCLUSÃO

Nosso estudo demonstra que espécies de plantas congênicas cujas populações compartilham o mesmo habitat e assembleia local de formigas diferem no tamanho e produtividade dos seus NEFs e, conseqüentemente, na diversidade e frequência de visitaçã de formigas associadas. A espécie que fornece maiores volumes e qualidade de néctar em NEFs maiores atrai uma maior riqueza e abundância de formigas, inclusive de espécies dominantes, em oposição as outras duas espécies nas quais se observa NEFs menores e com menor produtividade. Além disso, a existência de resposta induzida mediante dano varia entre as espécies. Neste trabalho amostramos o mesmo conjunto de plantas antes e depois da herbivoria simulada, fortalecendo a evidência que essas plantas respondem efetivamente à herbivoria simulada aumentando a quantidade e a qualidade do néctar acessível às formigas. Ainda, nosso estudo contribui para o entendimento de quais espécies tem maior controle na produção e qualidade das defesas indiretas em um sistema mais econômico de resposta induzida. Nossos resultados demonstram que as diferenças interespecíficas na quantidade e qualidade do néctar extrafloral gera um gradiente de disponibilidade de recursos e atratividade entre as espécies de *Chamaecrista*, e que tais diferenças moldam os padrões de diversidade e dominância de formigas. Finalmente, o resultado da interação com formigas possivelmente difere entre as três *Chamaecristas* desse sistema, em virtude dos padrões observados.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará por disponibilizar as dependências da Fazenda Experimental Vale do Curu para o desenvolvimento deste estudo; ao Dr. Ricardo Eduardo Vicente pela identificação das espécies de formigas.

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

CLSA, AN e IACC idealizaram as questões, o delineamento experimental e o método executado; CLSA coletou e analisou os dados, e conduziu a redação do manuscrito. Todos os autores contribuíram criticamente para a interpretação dos resultados, redação e consolidação do manuscrito, e deram a aprovação final para publicação.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, A. A.; RUTTER, M. T. Dynamic Anti-Herbivore Defense in Ant-Plants: the Role of Induced Responses. **Oikos**, v. 83, n. 2, p. 227, 1998.
- ALVARES, C. A. *et al.* Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 22, n. 6, p. 711–728, dez. 2013.
- ANDERSEN, A. N. Regulation of “momentary” diversity by dominant species in exceptionally rich ant communities of the Australian seasonal tropics”. **American Naturalist**, v. 140, n. 3, p. 401–420, 1992.
- APPLE, J. L.; FEENER, D. H. Ant visitation of extrafloral nectaries of *Passiflora*: the effects of nectary attributes and ant behavior on patterns in facultative ant-plant mutualisms. **Oecologia**, v. 127, n. 3, p. 409–416, 2001.
- ARAÚJO, D. R. *et al.* Variabilidade espacial de atributos físicos em solo submetido à diferentes tipos de uso e manejo. **Revista Caatinga**, v. 27, n. 2, p. 101–115, 2014.
- BAKER-MÉIO, B.; MARQUIS, R. J. Context-dependent benefits from ant-plant mutualism in three sympatric varieties of *Chamaecrista desvauxii*. **Journal of Ecology**, v. 100, n. 1, p. 242–252, 2012.
- BELCHIOR, C.; SENDOYA, S. F.; DEL-CLARO, K. Temporal variation in the abundance and richness of foliage-dwelling ants mediated by extrafloral nectar. **PLoS ONE**, v. 11, n. 7, p. 1–17, 2016.
- BENTLEY, B. L. The Protective Function of Ants Visiting the Extrafloral Nectaries of *Bixa Orellana* (Bixaceae). **Journal of Ecology**, v. 65, n. 1, p. 27–38, 1977.
- BIXENMANN, R. J.; COLEY, P. D.; KURSAR, T. A. Is extrafloral nectar production induced by herbivores or ants in a tropical facultative ant-plant mutualism? **Oecologia**, v. 165, n. 2, p. 417–425, 2011.
- BLÜTHGEN, N.; FIEDLER, K. Preferences for sugars and amino acids and their conditionality in a diverse nectar-feeding ant community. **Journal of Animal Ecology**, v. 73, n. 1, p. 155–166, 2004a.
- BLÜTHGEN, N.; FIEDLER, K. Competition for Composition: lessons from Nectar-Feeding Ant Communities. **Ecology**, v. 85, n. 6, p. 1479–1485, 2004b.
- BLÜTHGEN, N.; GOTTSBERGER, G.; FIEDLER, K. Sugar and amino acid composition of ant-attended nectar and honeydew sources from an Australian rainforest. **Austral Ecology**, v. 29, n. 4, p. 418–429, 2004.
- BLÜTHGEN, N.; MEZGER, D.; LINSENMAIR, K. E. Ant-hemipteran trophobioses in a Bornean rainforest - Diversity, specificity and monopolisation. **Insectes Sociaux**, v. 53, n. 2, p. 194–203, 2006.
- BLÜTHGEN, N.; STORK, N.; FIEDLER, K. Bottom-up control and co-occurrence in complex communities: honeydew and nectar determine a rainforest ant mosaic. **Oikos**, v. 106, n. 2, p. 344–358, 2004.
- BRONSTEIN, J. L. The Contribution of Ant-Plant Protection Studies to Our Understanding of Mutualism. **Biotropica**, v. 30, n. 2, p. 150–161, 1998.

- BYK, J.; DEL-CLARO, K. Ant-plant interaction in the Neotropical savanna: direct beneficial effects of extrafloral nectar on ant colony fitness. **Population Ecology**, v. 53, n. 2, p. 327–332, 2011.
- CALIXTO, E. S. *et al.* Optimal Defense Theory in an ant-plant mutualism: extrafloral nectar as an induced defense is maximized in the most valuable plant structures. **Journal of Ecology**, v. 109, n. 1, p. 167–178, 2020.
- CALIXTO, E. S.; LANGE, D.; DEL-CLARO, K. Net benefits of a mutualism: influence of the quality of extrafloral nectar on the colony fitness of a mutualistic ant. **Biotropica**, 2021.
- CHAMBERLAIN, S. A.; NATHANIEL HOLLAND, J. Quantitative synthesis of context dependency in ant-plant protection mutualisms. **Ecology**, v. 90, n. 9, p. 2384–2392, 2009.
- COLEY, P. D.; BATEMAN, M. L.; KURSAR, T. A. The effects of plant quality on caterpillar growth and defense against natural enemies. **Oikos**, v. 115, n. 2, p. 219–228, 2006.
- COLEY, P. D.; ENDARA, M. J.; KURSAR, T. A. Consequences of interspecific variation in defenses and herbivore host choice for the ecology and evolution of Inga, a speciose rainforest tree. **Oecologia**, v. 187, n. 2, p. 361–376, 2018.
- COUTINHO, Í. A. C.; MEIRA, R. M. S. A. Structural diversity of extrafloral nectaries in *Chamaecrista* sect. *Apoucouita*. **Botany**, v. 93, n. 6, p. 379–388, 2015.
- COUTINHO, Í. A. C.; VALENTE, V. M. M.; MEIRA, R. M. S. A. Ontogenetic, anatomical and histochemical study of the extrafloral nectaries of *Sapium biglandulosum* (Euphorbiaceae). **Australian Journal of Botany**, v. 58, n. 3, p. 224–232, 2010.
- CRUZ, N. G. *et al.* Ant associations in the Neotropical shrub *Turnera subulata* (Turneraceae): costs or benefits to the host plant? **Austral Ecology**, v. 44, n. 1, p. 60–69, 2018.
- DAFNI, A.; KEVAN, P. G.; HUSBAND, B. C. Practical pollination biology. Chicago: University of Chicago Press, 2005.
- DÁTTILO, W. *et al.* Secretory activity of extrafloral nectaries shaping multitrophic ant-plant-herbivore interactions in an arid environment. **Journal of Arid Environments**, v. 114, p. 104–109, 2015.
- DAVIDSON, D. W. The role of resource imbalances in the evolutionary ecology of tropical arboreal ants. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 61, n. 2, p. 153–181, 1997.
- DAVIDSON, D. W. Resource discovery versus resource domination in ants: a functional mechanism for breaking the trade-off. **Ecological Entomology**, v. 23, p. 484–490, 1998.
- DEL-CLARO, K. *et al.* Ant pollination of *Paepalanthus lundii* (Eriocaulaceae) in Brazilian savanna. **Annals of Botany**, v. 123, n. 7, p. 1159–1165, 2019.
- DÍAZ-CASTELAZO, C. *et al.* Morphological and secretory characterization of extrafloral nectaries in plants of coastal Veracruz, Mexico. **Annals of Botany**, v. 96, n. 7, p. 1175–1189, 2005.
- DOWD, D. J. O. Foliar nectar production and ant activity on a Neotropical tree, *Ochroma pyramidale*. **Oecologia**, v. 43, n. 2, p. 233–248, 1979.
- FAGUNDES, R. *et al.* Differences among ant species in plant protection are related to production of extrafloral nectar and degree of leaf herbivory. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 122, n. 1, p. 71–83, 2017.

- FLORA DO BRASIL 2020. Projeto Flora do Brasil 2020 (em constante atualização). **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>. Acesso em: 15 abr. 2020.
- FLORES-FLORES, R. V. *et al.* Food source quality and ant dominance hierarchy influence the outcomes of ant-plant interactions in an arid environment. **Acta Oecologica**, v. 87, n. February, p. 13–19, 2018.
- GONÇALVES-SOUZA, T. Induced biotic response in Amazonian ant-plants: the role of leaf damage intensity and plant-derived food rewards on ant recruitment. **Sociobiology**, v. 63, n. 3, p. 919–924, 2016.
- GONZÁLEZ-TEUBER, M. *et al.* Increased Host Investment in Extrafloral Nectar (EFN) Improves the Efficiency of a Mutualistic Defensive Service. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, 2012.
- HEIL, M. *et al.* On benefits of indirect defence: short- and long-term studies of antiherbivore protection via mutualistic ants. **Oecologia**, v. 126, n. 3, p. 395–403, 2001a.
- HEIL, M. *et al.* Extrafloral nectar production of the ant-associated plant, *Macaranga tanarius*, is an induced, indirect, defensive response elicited by jasmonic acid. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 3, p. 1083–1088, jan. 2001b.
- HEIL, M. Indirect defence via tritrophic interactions. **New Phytologist**, v. 178, n. 1, p. 41–61, 2008.
- HEIL, M. Nectar: generation, regulation and ecological functions. **Trends in Plant Science**, v. 16, n. 4, p. 191–200, 2011.
- HEIL, M. Extrafloral Nectar at the Plant-Insect Interface: a Spotlight on Chemical Ecology, Phenotypic Plasticity, and Food Webs. **Annual Review of Entomology**, v. 60, n. 1, p. 213–232, 2015.
- HEIL, M.; MCKEY, D. Protective Ant-plant Interactions as Model Systems in Ecological and Evolutionary Research. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 34, p. 425–453, 2003.
- HOLLAND, J. N.; CHAMBERLAIN, S. A.; HORN, K. C. Optimal defence theory predicts investment in extrafloral nectar resources in an ant-plant mutualism. **Journal of Ecology**, v. 97, n. 1, p. 89–96, 2009.
- HOLLAND, J. N.; CHAMBERLAIN, S. A.; HORN, K. C. Temporal variation in extrafloral nectar secretion by reproductive tissues of the senita cactus, *Pachycereus schottii* (Cactaceae), in the Sonoran Desert of Mexico. **Journal of Arid Environments**, v. 74, n. 6, p. 712–714, 2010.
- IPECE. PERFIL BÁSICO MUNICIPAL PENTECOSTE. <http://www.ipece.ce.gov.br>, 2009.
- IRWIN, H. S.; BARNEBY, R. C. The American Cassiinae: a synoptical revision of Leguminosae tribe Cassieae subtribe Cassiinae in the New World. **Memoirs of the New York Botanical Garden**, v. 35, p. 1–918, 1982.
- JONES, I. M.; KOPTUR, S. Dynamic extrafloral nectar production: the timing of leaf damage affects the defensive response in senna mexicana var. *Chapmanii* (Fabaceae). **American Journal of Botany**, v. 102, n. 1, p. 58–66, 2015.
- KARBAN, R. The ecology and evolution of induced responses to herbivory and how plants perceive risk. **Ecological Entomology**, v. 45, n. 1, p. 1–9, 2020.

- KATAYAMA, N.; SUZUKI, N. Anti-herbivory defense of two *Vicia* species with and without extrafloral nectaries. **Plant Ecology**, v. 212, n. 5, p. 743–752, 2011.
- KAY, A. D. *et al.* A carbohydrate-rich diet increases social immunity in ants. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 281, n. 1778, 2014.
- KOPTUR, S.; JONES, I. M.; PEÑA, J. E. The influence of host plant extrafloral nectaries on multitrophic interactions: an experimental investigation. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, p. 1–18, 2015.
- LACH, L.; PARR, C. L.; ABBOTT, K. L. **Ant Ecology**. New York: [s.n.].
- LANAN, M. C.; BRONSTEIN, J. L. An ant's-eye view of an ant-plant protection mutualism. **Oecologia**, v. 172, n. 3, p. 779–790, 2013.
- LANGE, D.; CALIXTO, E. S.; DEL-CLARO, K. Variation in extrafloral nectary productivity influences the ant foraging. **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, p. 1–13, 2017.
- LEVINE, N. *et al.* Investment in reward by ant-dispersed plants consistently selects for better partners along a geographic gradient. **AoB PLANTS**, v. 11, n. 3, p. 1–13, 2019.
- LIMA, L. D.; ANTONIALLI-JUNIOR, W. F. Foraging strategies of the ant *Ectatomma vizottoi* (Hymenoptera, Formicidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 57, n. 4, p. 392–396, dez. 2013.
- MARAZZI, B. *et al.* Extrafloral nectaries in Leguminosae: phylogenetic distribution, morphological diversity and evolution. **Australian Systematic Botany**, v. 32, n. 6, p. 409–458, 2019.
- MARAZZI, B.; BRONSTEIN, J. L.; KOPTUR, S. The diversity, ecology and evolution of extrafloral nectaries: Current perspectives and future challenges. **Annals of Botany**, v. 111, n. 6, p. 1243–1250, 2013.
- MATOS, S. S.; MELO, A. L.; SANTOS-SILVA, J. Caesalpinioideae e Cercidoideae (Leguminosae) no Parque Estadual Mata da Pimenteira, Semiárido de Pernambuco, Brasil. **Rodriguesia**, v. 70, 2019.
- MCCALL, A. C.; FORDYCE, J. A. Can optimal defence theory be used to predict the distribution of plant chemical defences? **Journal of Ecology**, v. 98, n. 5, p. 985–992, 2010.
- MCKEY, D. Adaptive Patterns in Alkaloid Physiology. **The American Naturalist**, v. 108, n. 961, p. 305–320, 1974.
- MELATI, B. G.; LEAL, L. C. Aggressive bodyguards are not always the best: preferential interaction with more aggressive ant species reduces reproductive success of plant bearing extrafloral nectaries. **PLoS ONE**, v. 13, n. 6, p. 1–13, 2018.
- MILLER, T. E. X. Does having multiple partners weaken the benefits of facultative mutualism? A test with cacti and cactus-tending ants. **Oikos**, v. 116, n. 3, p. 500–512, 2007.
- MONDOR, E. B.; TREMBLAY, M. N.; MESSING, R. H. Extrafloral nectary phenotypic plasticity is damage- and resource-dependent in *Vicia faba*. **Biology Letters**, v. 2, n. 4, p. 583–585, 2006.
- NASCIMENTO, E. A.; DEL-CLARO, K. Ant visitation to extrafloral nectaries decreases herbivory and increases fruit set in *Chamaecrista debilis* (Fabaceae) in a Neotropical savanna. **Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 205, n. 11, p. 754–756,

2010.

NESS, J. H. *Catalpa bignonioides* alters extrafloral nectar production after herbivory and attracts ant bodyguards. **Oecologia**, v. 134, n. 2, p. 210–218, 2003.

NICOLSON, S. W.; NEPI, M.; PACINI, E. **Nectaries and Nectar**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2007.

NOGUEIRA, A. *et al.* Geographic mosaic of plant evolution: extrafloral nectary variation mediated by ant and herbivore assemblages. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, p. 1–24, 2015.

NOGUEIRA, A. *et al.* Variation in the production of plant tissues bearing extrafloral nectar explains temporal patterns of ant attendance in Amazonian understory plants. **Journal of Ecology**, v. 108, n. 4, p. 1578–1591, 2020.

NOGUEIRA, A.; REY, P. J.; LOHMANN, L. G. Evolution of extrafloral nectar: adaptive process and selective regime changes from forest to savanna. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 25, n. 11, p. 2325–2340, 2012.

OLIVEIRA, P. *et al.* Interaction between ants, extrafloral nectar and insect herbivores in Neotropical coastal sand dunes: herbivore deterrence by visiting ants increases fruit set in *Opuntia stricta* (Cactaceae). **Functional Ecology**, v. 13, p. 623–631, 1999.

OLIVEIRA, P. S.; FREITAS, A. V. L. Ant-plant-herbivore interactions in the neotropical cerrado savanna. **Naturwissenschaften**, v. 91, n. 12, p. 557–570, 2004.

PACELHE, F. T. *et al.* Nectar quality affects ant aggressiveness and biotic defense provided to plants. **Biotropica**, v. 51, n. 2, p. 196–204, 2019.

PALMER, T. *et al.* Breakdown of an Ant-Plant Mutualism Follows the Loss of Large Herbivores from an African Savanna. **Science**, v. 319, n. 5860, p. 192–195, 2008.

PARR, C. L. *et al.* Constraint and competition in assemblages: a cross-continental and modeling approach for ants. **American Naturalist**, v. 165, n. 4, p. 481–494, 2005.

PHILLIPS, N. **Package “yarr” R package version 0.1.5**, 2017. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/web/packages/yarr/index.html>>

PINA, A. L. C. B. *et al.* Dew absorption by the leaf trichomes of *Combretum leprosum* in the Brazilian semiarid region. **Functional Plant Biology**, v. 43, n. 9, p. 851–861, 2016.

PULICE, C. E.; PACKER, A. A. Simulated herbivory induces extrafloral nectary production in *Prunus avium*. **Functional Ecology**, v. 22, n. 5, p. 801–807, 2008.

QUEIROZ, R. T. DE; LOIOLA, M. I. B. O gênero *Chamaecrista* Moench (Caesalpinioideae) em áreas do entorno do Parque Estadual das Dunas de Natal, Rio Grande do Norte, Brasil. **Hoehnea**, v. 36, n. 4, p. 725–736, 2009.

RADHIKA, V. *et al.* Testing the optimal defence hypothesis for two indirect defences: extrafloral nectar and volatile organic compounds. **Planta**, v. 228, n. 3, p. 449–457, 2008.

RHOADES, D. F. Evolution of plant chemical defense against herbivores. In Rosenthal G. A., & Janzen D. H., eds. **Herbivores: Their Interaction with Secondary Plant Metabolites**. New York: Academic Press, 1979.

RIBEIRO, L. F. *et al.* Extrafloral nectar as a driver of arboreal ant communities at the site-scale in Brazilian savanna. **Austral Ecology**, v. 43, n. 6, p. 672–680, 2018.

- RIBEIRO, L. F. *et al.* Different trophic groups of arboreal ants show differential responses to resource supplementation in a neotropical savanna. **Oecologia**, v. 190, n. 2, p. 433–443, 2019.
- RICO-GRAY, V.; OLIVEIRA, P. S. **The Ecology and Evolution of Ant-Plant Interactions**. Chicago: University of Chicago Press, 2007.
- RIOS, R. S.; MARQUIS, R. J.; FLUNKER, J. C. Population variation in plant traits associated with ant attraction and herbivory in *Chamaecrista fasciculata* (Fabaceae). **Oecologia**, v. 156, n. 3, p. 577–588, 2008.
- ROCHA, M. L. DA C. *et al.* Production of extrafloral nectar in the Neotropical shrub *Turnera subulata* mediated by biotic and abiotic factors. **Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 260, n. October, p. 151483, 2019.
- ROSUMEK, F. B. *et al.* Ants on plants: a meta-analysis of the role of ants as plant biotic defenses. **Oecologia**, v. 160, n. 3, p. 537–549, 2009.
- ROY, R. *et al.* Review: Nectar biology: from molecules to ecosystems. **Plant Science**, v. 262, n. May, p. 148–164, 2017.
- RSTUDIO CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **RStudio: Integrated Development for R**. Boston, MA. Disponível em: <https://www.rstudio.com/>. Acesso em: 12 set. 2020.
- RUDGERS, J. A. Enemies of herbivores can shape plant traits: selection in a facultative ant-plant mutualism. **Ecology**, v. 85, n. 1, p. 192–205, 2004.
- RUDGERS, J. A.; GARDENER, M. C. Extrafloral nectar as a resource mediating multispecies interactions. **Ecology**, v. 85, n. 6, p. 1495–1502, 2004.
- RUTTER, M. T.; RAUSHER, M. D. Natural selection on extrafloral nectar production in *Chamaecrista fasciculata*: the costs and benefits of a mutualism trait. **Evolution**, v. 58, n. 12, p. 2657–2668, 2004.
- SHENOY, M. *et al.* Composition of Extrafloral Nectar Influences Interactions between the Myrmecophyte *Humboldtia brunonis* and its Ant Associates. **Journal of Chemical Ecology**, v. 38, n. 1, p. 88–99, 2012.
- SILVA, C. H. F. *et al.* Extrafloral nectar as a driver of ant community spatial structure along disturbance and rainfall gradients in Brazilian dry forest. **Journal of Tropical Ecology**, v. 35, n. 6, p. 280–287, 2019.
- SILVA, W. L. S.; ROCHA, A. E.; SANTOS, J. U. M. Leguminosae em savanas do estuário amazônico brasileiro. **Rodriguésia**, v. 65, n. 2, p. 329–353, jun. 2014.
- SKAUG, A. H. *et al.* **glmmADMB: generalized linear mixed models using AD Model BuilderR package version 0.8.3.4**, 2018.
- STUBLE, K. L. *et al.* Dominance hierarchies are a dominant paradigm in ant ecology (Hymenoptera: Formicidae), but should they be? and what is a dominance hierarchy anyways? **Myrmecological News**, v. 24, p. 71–81, 2017.
- VIEIRA, A. S.; FERNANDES, W. D.; ANTONIALLI-JUNIOR, W. F. Behavioral differentiation and ovarian development of unmated Gynes, queens, and workers of *Ectatomma vizottoi* Almeida 1987 (Formicidae, Ectatomminae). **Psyche: A Journal of Entomology**, v. 2012, p. 1–8, 2012.

VILELA, A. A.; TOREZAN-SILINGARDI, H. M.; DEL-CLARO, K. Conditional outcomes in ant-plant-herbivore interactions influenced by sequential flowering. **Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 209, n. 7, p. 359–366, 2014.

WARD, P. S. The Phylogeny and Evolution of Ants. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 45, n. 1, p. 23–43, 2014.

WILDER, S. M.; EUBANKS, M. D. Extrafloral nectar content alters foraging preferences of a predatory ant. **Biology Letters**, v. 6, n. 2, p. 177–179, 2009.

YAMAWO, A.; SUZUKI, N.; TAGAWA, J. Extrafloral nectary-bearing plant *Mallotus japonicus* uses different types of extrafloral nectaries to establish effective defense by ants. **Journal of Plant Research**, v. 132, n. 4, p. 499–507, 2019.

APÊNDICE A - TABELAS

Tabela 01. Padrão de variação dos descritores de tamanho dos nectários extraflorais (NEFs) e do néctar extrafloral entre as três espécies de *Chamaecrista* sob condições de campo. Área total de cada NEF corresponde à área superficial total da glândula; área secretora de cada NEF corresponde à concavidade central da glândula; secções longitudinal e transversal se referem às medidas lineares das áreas em relação pecíolo foliar; interna e externa se referem às medidas de secção da área secretora e área total, respectivamente. DP = desvio padrão.

Descritores dos NEFs e do néctar extrafloral	<i>C. diphylla</i>		<i>C. calycioides</i>		<i>C. duckeana</i>		Estatística			Figuras
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	F	P	N	
Área total (mm ²)	0.07	0.01	0.12	0.03	0.49	0.19	128.1	< 0.001	83	S1 Fig. 1
Área secretora (mm ²)	0.01	0.004	0.03	0.01	0.14	0.07	136.01	< 0.001	83	Fig. 2A
Secção longitudinal externa (mm)	0.31	0.03	0.39	0.04	0.76	0.17	156.2	< 0.001	83	-
Secção transversal externa (mm)	0.26	0.02	0.39	0.05	0.74	0.14	247.6	< 0.001	83	-
Secção longitudinal interna (mm)	0.13	0.03	0.21	0.04	0.39	0.15	67.2	< 0.001	83	-
Secção transversal interna (mm)	0.10	0.02	0.19	0.05	0.36	0.12	92.1	< 0.001	83	-
Volume de néctar (µl/folha)	0.01	0.01	0.03	0.05	0.09	0.13	6.01	0.005	45	Fig. 2B
Massa total de açúcares (mg/folha)	0.0005	0.0005	0.0021	0.0024	0.0058	0.0067	5.38	0.01	45	Fig. 2D
Volume de néctar (µl/planta)	0.07	0.10	0.32	0.37	0.63	0.68	7.15	0.002	45	-
Concentração de açúcares (% <i>Brix</i>)	2.24	0.55	4.43	2.32	4.24	1.29	3.99	0.03	45	Fig. 2C
Massa total de açúcares (mg/planta)	0.0041	0.0046	0.0220	0.0239	0.0403	0.0362	5.12	0.01	45	-

Proporção de folhas com NEFs ativos	0.31	0.19	0.31	0.19	0.30	0.18	0.04	0.96	90	S2 Fig. 2
-------------------------------------	------	------	------	------	------	------	------	------	----	-----------

APÊNDICE B - GRÁFICOS E FIGURAS

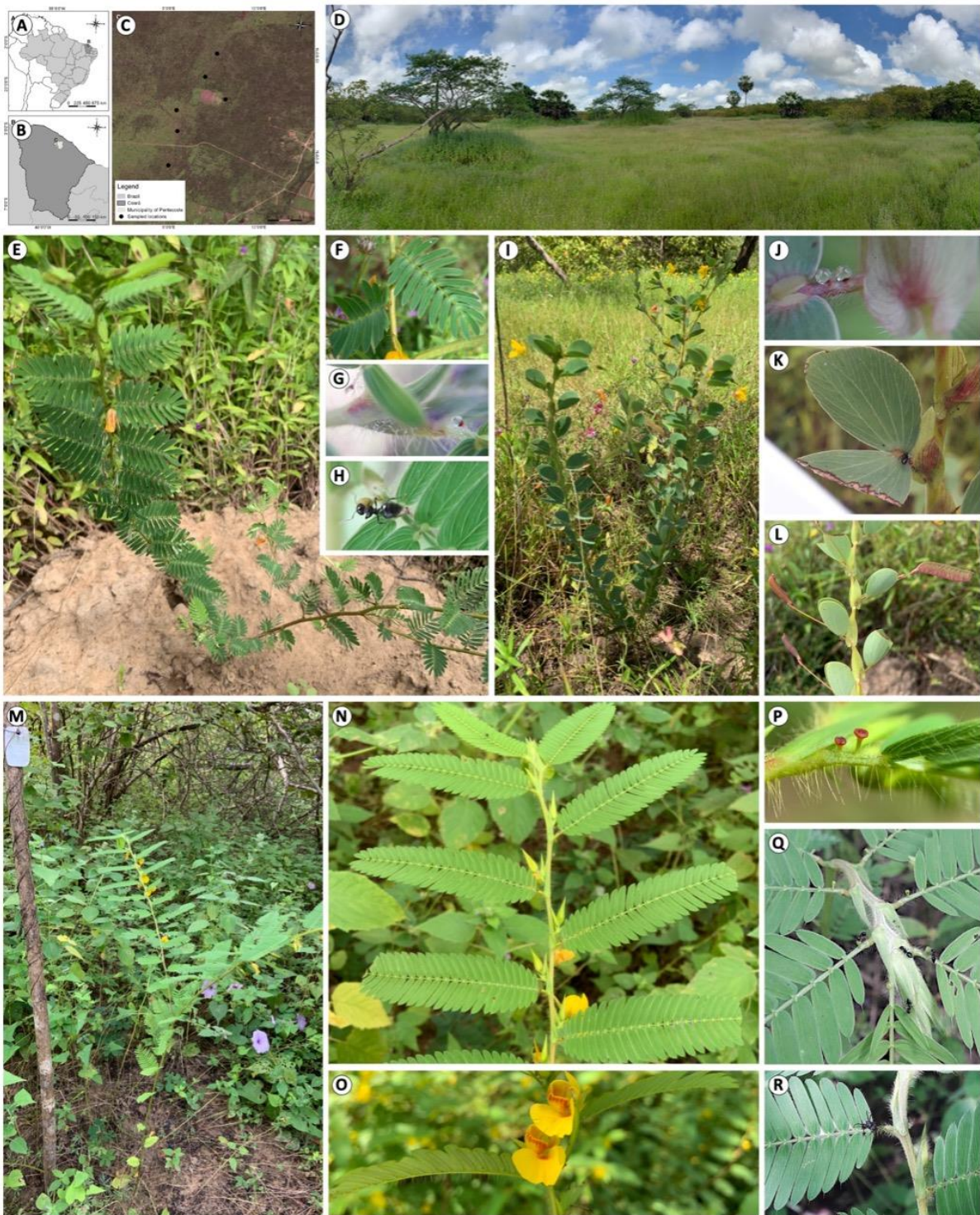


Figura 1. Mapa de localização da área de estudo e imagens das três espécies focais de *Chamaecrista* deste estudo, com destaque para as estruturas vegetativas, incluindo os NEFs, reprodutivas e interação das plantas com formigas. (A) América do Sul com destaque para o Brasil e o estado do Ceará. (B) Localização do Município de Pentecoste, no estado do Ceará. (C-D) Locais de amostragem e área de coleta dentro da Fazenda Experimental Vale do Curu. (E) Hábito subarbusitivo de *C. calycioides* no período de floração. (F-H) Destaque da folha; nectário extrafloral e formiga forrageando sobre o NEF de *C. calycioides*. (I) Hábito subarbusitivo de *C. diphylla* no período de floração. (J-L) Destaque dos nectários extraflorais; formiga forrageando sobre o NEF; folhas e frutos de *C. diphylla*. (M) Hábito

subarbustivo de *C. duckeana* no período de floração. (**N-R**) Destaque das folhas; flores; nectários extraflorais e formigas forrageando sobre os NEFs de *C. duckeana*. (**L; N**) Destaque das folhas com cerca de 20% da área foliar removida para o experimento de resposta induzida.

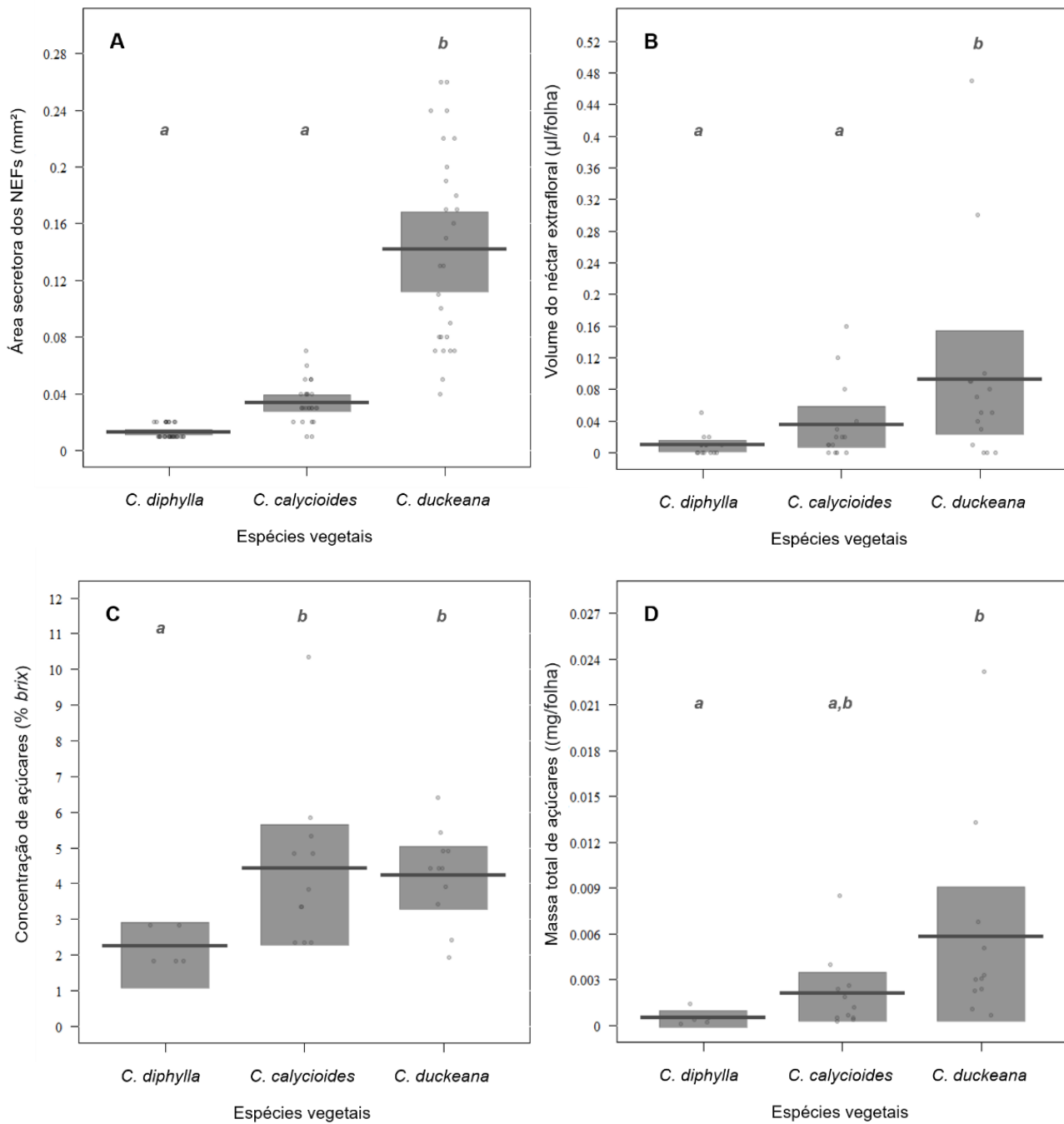


Figura 2. Variação da área secretora dos NEFs e dos descritores do néctar extrafloral sob condições de campo nas três espécies de *Chamaecrista*. **(A)** Tamanho dos NEFs representado pela área secretora de cada nectário (mm²). **(B)** Volume do néctar extrafloral secretado (µl/folha). **(C)** Concentração de açúcares do néctar extrafloral (% Brix). **(D)** Massa total de açúcares do néctar extrafloral (mg/folha). A linha central representa a média; os pontos representam os dados brutos; a caixa cinza representa o intervalo de confiança a 95%; e as letras diferentes representam diferenças entre as espécies de *Chamaecrista* (Tukey: $P < 0.05$).

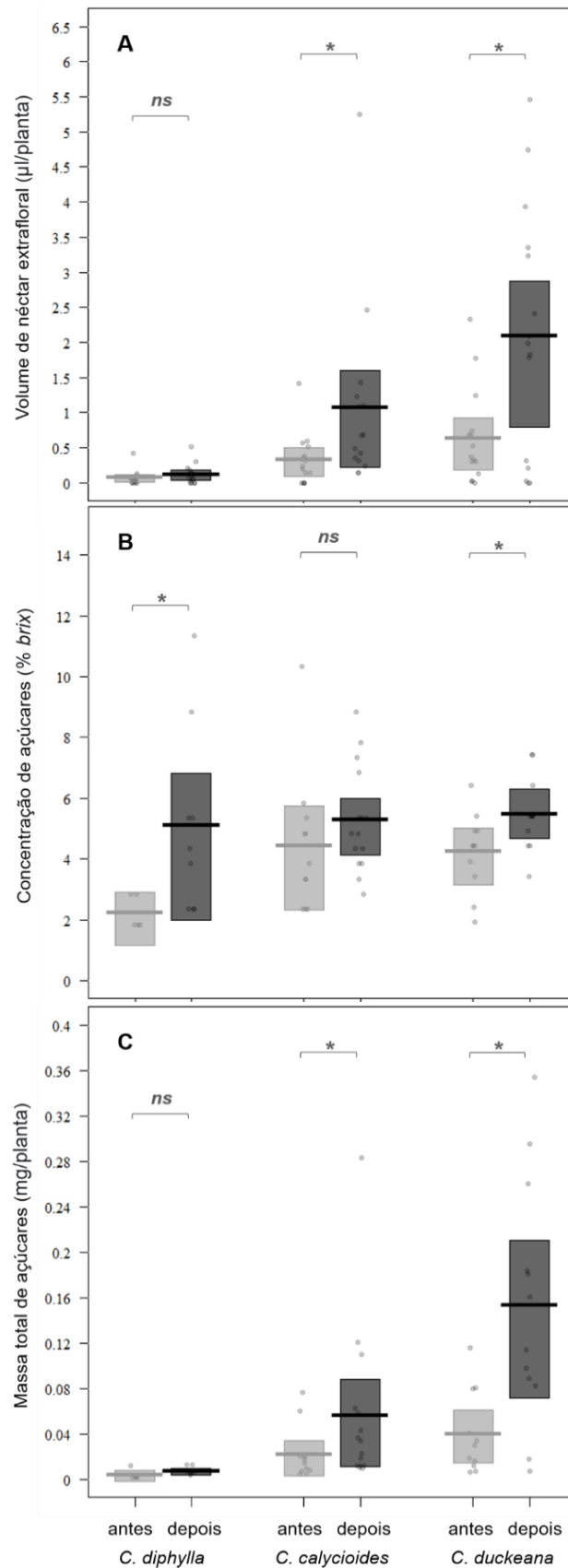


Figura 3. Produção do néctar extrafloral antes e depois da aplicação da herbivoria foliar nas três espécies de *Chamaecrista*. A herbivoria foliar aplicada representou 20% de área foliar removida sistematicamente na planta em 50% das folhas. **(A)** Volume de néctar extrafloral (µl/planta). **(B)** Concentração de açúcares (% Brix). **(C)** Massa total de açúcares do néctar extrafloral (mg/planta). A linha central representa a média, os pontos representam os dados brutos, e a caixa cinza representa o intervalo de confiança a 95%. Destacamos nos gráficos os resultados das comparações antes e depois da herbivoria para cada espécie: ns = não significativo; * = $P < 0.016$ (α de Bonferroni).

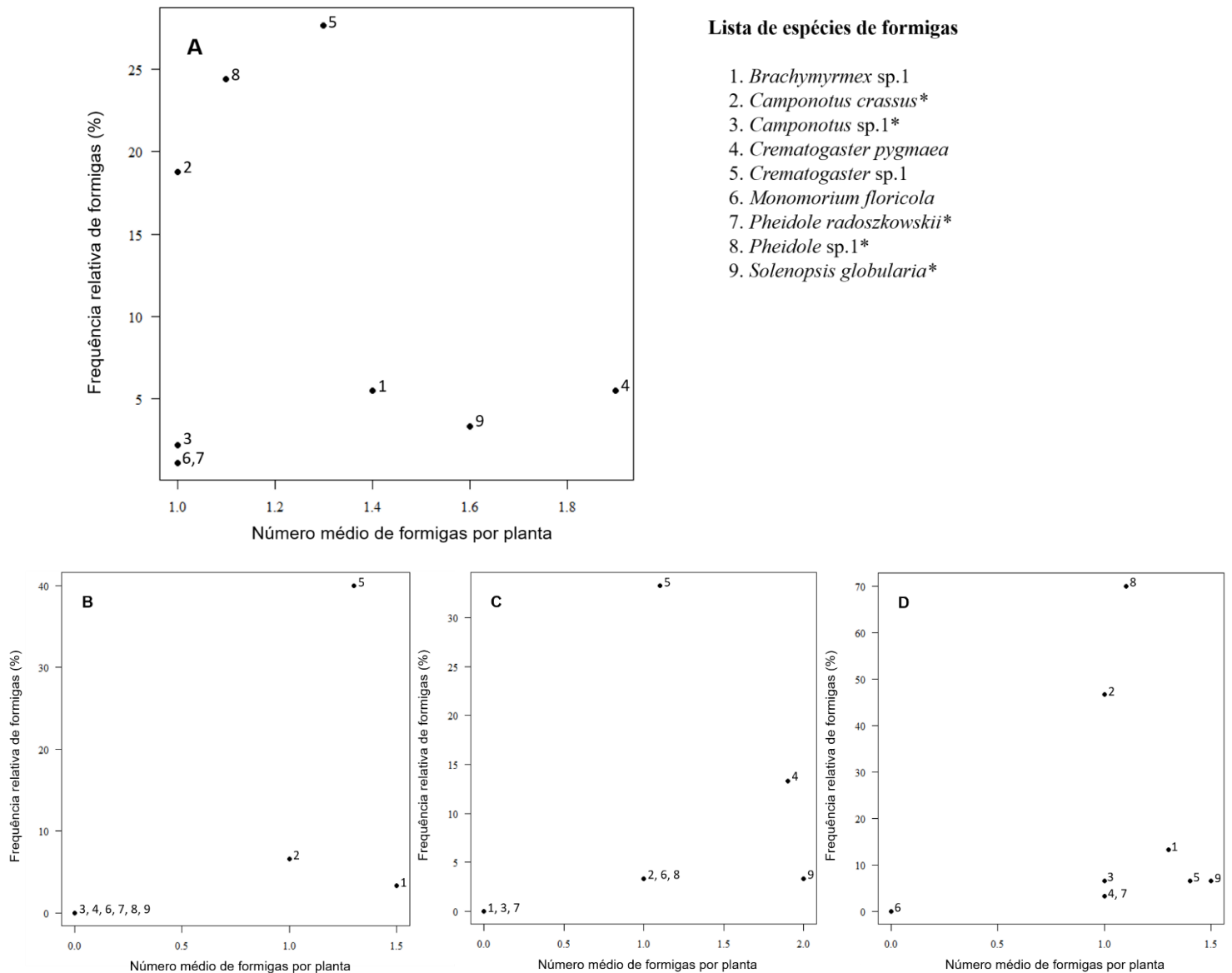


Figura 4. Variação na frequência relativa (%) e no número médio de formigas por planta. **(A)** Frequência relativa e número médio de formigas calculado para cada espécie de formiga visitando os NEFs das três espécies de *Chamaecrista* (N = 90 plantas, sendo 30 plantas de cada espécie). Cada ponto no gráfico representa uma das nove espécies de formigas amostradas neste estudo. Considerando a frequência relativa das espécies de formigas nas plantas, as espécies 5, 8 e 2 são numericamente dominantes na área de estudo e ocupam mais de 15% das plantas quando consideramos as três espécies vegetais conjuntamente. **(B)** Frequência relativa e número médio calculado para cada espécie de formiga visitando os NEFs de *C. diphylla* (N = 30 plantas). **(C)** Frequência relativa e número médio calculado para cada espécie de formiga visitando os NEFs de *C. calycioides* (N = 30 plantas). **(D)** Frequência relativa e número médio calculado para cada espécie de formiga visitando os NEFs de *C. duckeana* (N = 30 plantas). Quando consideramos as três espécies vegetais separadamente, as formigas dominantes ocuparam um conjunto de plantas superior a 30%. O asterisco (*) ao lado do nome das espécies de formigas indica as espécies congêneras daquelas classificadas como as mais agressivas e dominantes comportamentalmente no estudo de Melati & Leal (2018), destacando-se o gênero *Pheidole* e a espécie *Camponotus crassus* dominantes numéricos em nosso estudo.

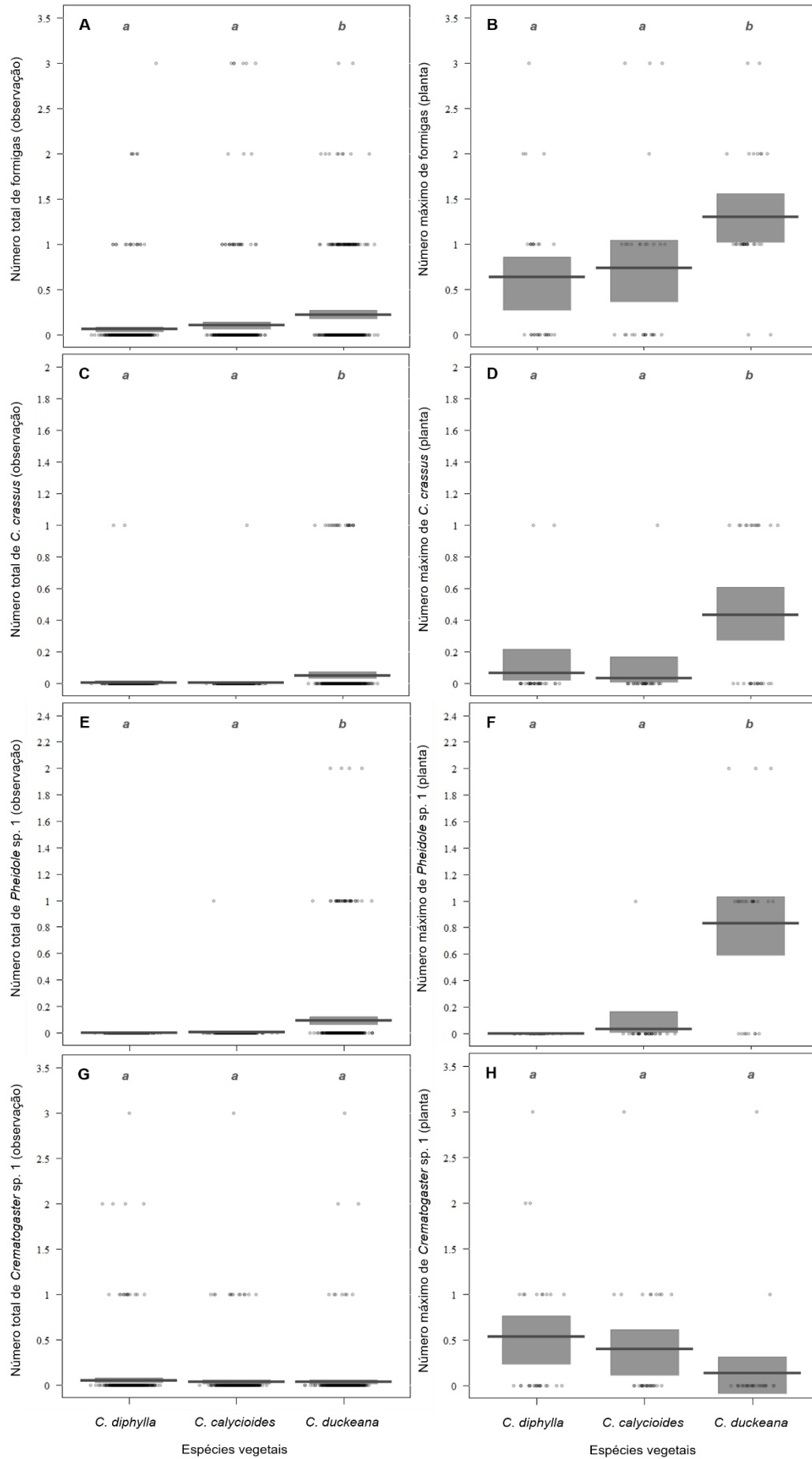


Figura 5. Variação do número de formigas em cada observação e do número máximo de formigas no conjunto de observações por planta nas três espécies de *Chamaecrista*. **(A)** Número de formigas por planta considerando todas as espécies de formigas observadas ao longo dos censos no campo e **(B)** número máximo de formigas por planta dentre todas as observações realizadas. **(C)** Número de formigas *Camponotus crassus* por planta considerando todas as observações e **(D)** número máximo de formigas *C. crassus* dentre todas as observações. **(E)** Número de formigas *Pheidole* sp. 1 por planta considerando todas as observações e **(F)** número máximo de formigas *Pheidole* sp. 1 dentre todas as observações. **(G)** Número de formigas *Crematogaster* sp. 1 por planta considerando todas as observações e **(H)** número máximo de formigas *Crematogaster* sp. 1 dentre todas as observações. A linha central representa a média, os pontos representam os dados brutos, e a caixa cinza representa o intervalo de confiança a 95%. As letras diferentes em cada gráfico representam diferenças entre as três espécies de *Chamaecrista* (Tukey: $P < 0.05$).

APÊNDICE C - MATERIAL SUPLEMENTAR

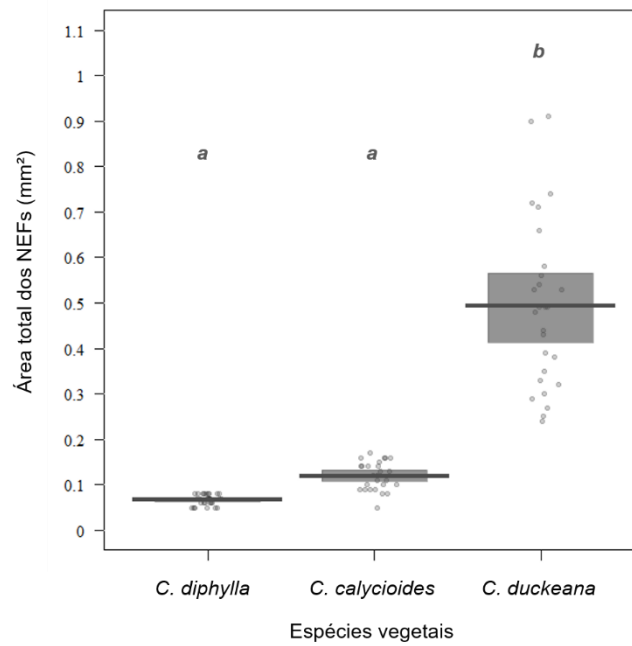


Figura 1. Diferenças no tamanho da área total dos NEFs (mm^2) entre as três espécies de *Chamaecrista*. A área total dos NEFs representa toda a área superficial da glândula. A linha central representa a média, os pontos representam os dados brutos, e a caixa cinza representa o intervalo de confiança a 95%. Destacamos os resultados das comparações entre espécies. As letras diferentes representam diferença nos resultados entre as três espécies de *Chamaecrista* (Tukey = $P < 0.05$).

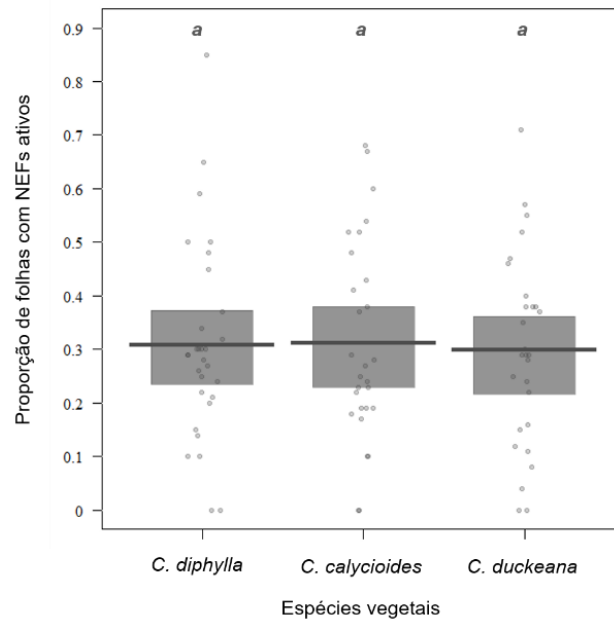


Figura 2. Proporção de folhas com NEFs ativos, isto é, com atividade secretora detectada na forma de brilho ou gota de néctar considerando as 90 plantas focais (30 de cada espécie). A linha central representa a média, os pontos representam os dados brutos, e a caixa cinza representa o intervalo de confiança a 95%. Destacamos os resultados das comparações entre espécies. As letras iguais representam semelhança nos resultados entre as três espécies de *Chamaecrista* (Tukey = $P > 0.05$).

Tabela 1. Lista de espécies de formigas e frequência absoluta (número de plantas que as operárias de cada espécie de formiga foram registradas) de cada espécie considerando o conjunto de 30 plantas focais de cada espécie de *Chamaecrista*.

Espécies de formigas	Frequência absoluta de formigas		
	<i>C. diphylla</i>	<i>C. calycioides</i>	<i>C. duckeana</i>
<i>Brachymyrmex</i> sp.1	1	0	4
<i>Camponotus crassus</i>	2	1	14
<i>Camponotus</i> sp.1	0	0	2
<i>Crematogaster pygmaea</i>	0	4	1
<i>Crematogaster</i> sp.1	12	10	2
<i>Monomorium florícola</i>	0	1	0
<i>Pheidole radoszkowskii</i>	0	0	2
<i>Pheidole</i> sp.1	0	1	21
<i>Solenopsis globularia</i>	0	1	2