

ANNA THICIANE FREITAS SANTOS

**Minha planta, minhas regras: influência de formigas nas visitas
de polinizadores e na reprodução de plantas portadoras de nectários
extraflorais**

FEIRA DE SANTANA

2017

ANNA THICIANE FREITAS SANTOS

**Minha planta, minhas regras: influência de formigas nas visitas
de polinizadores e na reprodução de plantas portadoras de nectários
extraflorais**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zoologia da Universidade Estadual de Feira de Santana, como um dos requisitos para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Dra. Laura Carolina Leal

FEIRA DE SANTANA

2017

Ficha Catalográfica – Biblioteca Central Julieta Carteado

Santos, Anna Thiciane Freitas
S233m Minha planta, minhas regras: influência de formigas nas visitas de polinizadores e na reprodução de plantas portadoras de nectários extraflorais / Anna Thiciane Freitas Santos. – Feira de Santana, 2017.
50f.: il.

Orientadora: Prof^a. Dra. Laura Carolina Leal de Sousa.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Programa de Pós-Graduação em Zoologia, 2017.

1. Mutualismo - Plantas e formigas. 2. Plantas e formigas - Mutualismo. 3. Polinização por insetos. 4. Turneraceae. 5. Néctar extrafloral. I. Sousa, Laura Carolina Leal de, orient. II. Universidade Estadual de Feira de Santana. III. Título.

CDU: 57

AGRADECIMENTOS

Depois de tantas aventuras neste mestrado, posso finalmente dizer: tenho uma dissertação pra chamar de minha! Que máximo! Se me perguntassem há uns dois anos atrás, eu responderia com toda certeza que não conseguiria, mas hoje, percebo que não poderia ser diferente. Duas palavras super me definem agora: felicidade e gratidão. Felicidade, por ter conseguido superar tantos desencontros durante estes dois anos, por ter aprendido tanta coisa em tão pouco (por alguns momentos pareceram tão longo) tempo, e por ter comigo pessoas que fazem a diferença. E gratidão, por todos aqueles que se dispuseram a me ajudar, que acreditaram em mim, e que são, sem dúvidas, responsáveis por eu estar vivendo este momento.

Deus, agradeço por estar presente em cada detalhe de minha vida, por tua infinita bondade e proteção e, acima de tudo, por abençoar e iluminar os meus caminhos. Agradeço aos meus pais, por terem me proporcionado sempre o melhor que puderam, e por estarem sempre comigo. Amo vocês! Meus irmãos, que são simplesmente os amores que me fazem querer ser sempre melhor. Seus lindos! Como amo vocês! Meus avós, que dividiram a missão de me criar, obrigada por tudo. Dinda, tios, tias, primos e primas, vocês, que sempre se preocuparam comigo, principalmente quando chegavam e me viam estudando, ou quando sentiam a minha falta em algum evento por eu ter ficado estudando, olha só, deu certo viu?! Eu Consegui! Amo vocês.

Agradeço à disciplina Ecologia de Campo, porque foi nela que o mestrado realmente começou pra mim. Mas, não teria conseguido sem duas pessoas em especial. Primeiramente, meu amigo Bode, Felipe para quem não o conhece, desde a graduação já sabia que você é especial, mas no mestrado você se mostrou um verdadeiro irmão. Sim, irmão da mesma mainha, daquele que acredita na gente quando nem a gente mesmo acredita. Que ouve, conversa, incentiva, ouve outra vez, apoia, ajuda e ainda faz a ponte entre aluna desesperada e a

orientadora nova. Obrigada, de verdade, por não ter me deixado desistir, pela paciência, por toda ajuda nas coletas, pelos momentos de estudo e pelas risadas, porque ninguém é de ferro, né? Você merece o que há de melhor na vida! Segundo, e não menos importante, agradeço a Laura, por ter acreditado em mim, por todas as conversas, pela paciência, apoio e incentivo. Obrigada pela oportunidade que me deu, por ter me ajudado tanto, por não ter aliviado nas correções e por ter me ensinado tanta coisa em tempo record! Você ensina dando o exemplo, e busca sempre dar o melhor de si em tudo que faz. Obrigada, acima de tudo, por fazer a diferença. Tive muita sorte de ter te encontrado pelo caminho, poucos são como você. E eu tenho muito orgulho da minha orientadora! Meu muito obrigada também a tio Paulo, por ajudar a “coisinha” a crescer, por todas as conversas, risadas, cafés, cookies, comandos, planilhas, gráficos e p’s, significativos ou não. Aprendi e aprendo muito com você! Ao grupo inteiro do melhor LENT-A do Brasil, que me acolheu tão bem, e deu todo suporte, desde o momento que cheguei por lá, como visitante ainda. Nelson, você também me ajudou bastante, e contribuiu muito para esta realização. Obrigada! E vamos realizar mais mini-cursos porque é só sucesso! Josi e Lidi, amigas dos momentos de angústias, desesperos, desabafos, fofocas, alegrias, bandeirão... Vocês são especiais, obrigada pela parceria forte! Pii, minha amiga de infância, irmã de coração, uma das pessoas que mais me incentiva, aconselha, dá força e torce por mim. Te agradeço por tudo que sempre fez por mim. Dedê, obrigada por todo incentivo, por estar sempre comigo, e se fazer presente em todos os momentos. Tenho certeza que sem você também tudo seria mais difícil. Por fim, agradeço aos professores e funcionários do PPGZOO por todo apoio e colaboração.

Sumário

RESUMO	7
ABSTRACT	9
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	10
Mutualismo e suas classificações.....	10
Interação entre plantas portadoras de nectários extraflorais e formigas.....	13
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17
INTRODUÇÃO	22
MATERIAIS E MÉTODOS	26
- Local e modelo de estudo.....	26
- Delineamento amostral	26
- Análise de dados	29
RESULTADOS	31
Formigas atendentes e sua influência na composição de polinizadores.....	31
Formigas atendentes e sua influência na produção de frutos e de sementes	32
DISCUSSÃO	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
Anexo	46

RESUMO

Indivíduos podem participar de várias interações mutualistas simultaneamente. Neste caso, o saldo desses mutualismos deve atuar em conjunto na determinação de aptidão dos indivíduos envolvidos nessas interações. Plantas portadoras de nectários extraflorais (NEFs) participam do mutualismo de defesa anti-herbivoria com formigas que podem afetar, direta ou indiretamente, a polinização dessas plantas. Para entendermos melhor esse sistema, postulamos quatro hipóteses: (1) a presença da formiga atendendo NEFs afeta o conjunto de polinizadores, (2) a presença da formiga atendendo NEFs afeta negativamente a polinização das plantas, (3) a composição de polinizadores muda com a agressividade da formiga que atende NEFs e (4) quanto maior a agressividade da formiga, maior a influência negativa na polinização. Para avaliar essas hipóteses, contamos e cronometramos as visitas de polinizadores em indivíduos de *Turnera subulata* (Turneraceae) cujos NEFs eram atendidos por formigas de diferentes níveis de agressividade e em indivíduos que não tinham seus NEFs atendidos por formigas. Acompanhamos o desenvolvimento, sobrevivência das flores e frutos e o número de sementes produzidas por cada indivíduo. A presença da formiga na planta diminuiu o número de visitas de abelhas. Já o número de visitas de borboletas foi menor em plantas atendidas pela segunda formiga mais agressiva. As proporções de frutos formados e de sementes produzidas foram menores em plantas atendidas pela espécie de formiga mais agressiva. Estes resultados indicam que mudanças no subconjunto de polinizadores não afetam o sucesso reprodutivo da planta, mas afetam a forma com que os polinizadores selecionam suas plantas parceiras no ambiente. Já interações com formigas mais agressivas trazem custos adicionais às plantas, que não estão diretamente ligados à polinização.

PALAVRAS CHAVE: interação formiga-planta, néctar extrafloral, polinização, saldo de mutualismos, *Turnera subulata*

ABSTRACT

Individuals can be involved in multiple mutualistic interactions simultaneously that can jointly determine its fitness. Plants bearing extrafloral nectaries (EFNs) are engaged in an anti-herbivory defensive mutualism with ants that can, direct or indirectly, affect the outcome of pollination of these plants. In order to better understand this system, we postulated four hypotheses: (1) ant presence on EFNs affects the composition of pollinators and (2) negatively affects the pollination service of these plants, (3) the composition of pollinators changes accordingly to the aggressiveness of the EFNs attending ant and (4) the greater the ant's aggressiveness, the greater its negative influence on plant pollination. We counted and timed the visits of pollinators in individuals of *Turnera subulata* (Turneraceae) whose NEFs were attended by ants with different levels of aggressiveness and in individuals that were not attended by ants. We monitored the development and survival of flowers and fruits and the number of seeds produced by each individuals. Ant presence on the EFNs decreased the number floral visits by bees and the number of flower visits by butterflies was smaller in plants attended by the second most aggressive ant. The proportions of fruits and seeds produced by plants were lower in plants attended by the most aggressive ant species. Changes in pollinators composition did not affected the plants reproductive success, but rather the way pollinators selected their partner plants in the environment. Interactions with more aggressive ants bring additional costs to plants, which are not directly linked to the pollination.

KEY WORDS: ant-plant interaction, extrafloral nectar, pollination, mutualism outcome, *Turnera subulata*

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Mutualismo e suas classificações

Mutualismos são interações interespecíficas onde ambos os participantes se beneficiam (Bronstein 1994). Estes benefícios são alcançados pela obtenção de produtos ou serviços que são caros ou impossíveis de serem obtidos na ausência de seus parceiros mutualistas (Bronstein 1994, 2001). Desse modo, para que um a interação seja um mutualismo, é necessário que o saldo final da interação seja positivo para ambos os participantes (Bull & Rice 1991). Mutualismos podem ser classificados de acordo com o número de participantes, podendo ser específicos, quando indivíduos de apenas um par de espécies interagem entre si (Dressler 1968; Janzen 1966, 1979) ou generalizados, quando três ou mais espécies participam da interação (Rudgers & Strauss 2004). Os mutualismos diferem também quanto a obrigatoriedade da interação. O mutualismo é obrigatório quando uma espécie não consegue sobreviver na ausência do produto ou serviço ofertado pelo seu parceiro de interação (Dunn et al. 2014). Já o mutualismo facultativo ocorre quando os indivíduos tem um ganho de aptidão ao interagirem com os mutualistas, mas não dependem exclusivamente dos serviços ou produtos ofertados por esses parceiros para sobreviver (Horvitz & Schemske 1984).

Estudos envolvendo mutualismos cresceram nas últimas décadas e muitas das maiores questões conceituais que permeiam a sua ecologia e evolução estão começando a ser identificadas (Jones et al. 2012). Por exemplo, torna-se cada vez mais evidente que mutualismos são interações comuns em todos os ecossistemas e que envolvem organismos de todos os reinos (Kothamasi *et al.* 2009). Da mesma forma, tem sido amplamente demonstrado que os benefícios recebidos por indivíduos que fazem parte dessas interações

são fundamentais para seu sucesso reprodutivo e para a sobrevivência e/ou diversificação dessas espécies ao longo do tempo evolutivo (Betts et al. 2015, Holland & Deangelis 2010, Jones et al. 2012, Leigh Jr 2010, Warren & Bradford 2014). Mas, além de benefícios aos parceiros, estes recursos ou serviços impõem custos ao indivíduo que o oferece (Ferrière et al. 2002). Os custos estão ligados, principalmente, à alocação de nutrientes e/ou energia tanto para a fabricação dos recursos ou prestação de serviços ofertados ao parceiro mutualista (Rutter & Rausher 2004, Urban & Richardson 2015). Por exemplo, na dispersão de sementes, os custos do mutualismo para as plantas podem ser associados à energia investida na produção de frutos e para os dispersores, à energia gasta no deslocamento até a planta e desta para locais de deposição das sementes. Tanto os custos (produção de produtos ou serviços) como os benefícios (obtenção de produtos ou serviços) dos mutualismos para cada indivíduo podem variar de forma previsível no tempo e no espaço (Bronstein 1994). Conseqüentemente, podemos esperar que o saldo desses mutualismos também variem ao longo dessas dimensões (Thompson 1988). Assim, uma interação que num determinado contexto é considerada mutualista pode se comportar como um antagonismo, a depender das forças bióticas e abióticas que atuem sobre saldo final da interação para os parceiros envolvidos (Bronstein 2001, Foster & Wenseleers 2006).

Variações na qualidade de cada parceiro de interação disponível no ambiente tem sido apontadas como um dos principais fatores bióticos que regulam o saldo de mutualismos generalizados (Bronstein 1994, Stanton 2003). Comumente, a qualidade do parceiro é determinada por características morfológicas e comportamentais das diferentes espécies, que moldam a atuação de cada uma delas dentro das interações das quais fazem parte (Gaume et al. 1997, Meunier et al. 1999). Por exemplo, algumas plantas mirmecófitas possuem espaços ociosos, chamados de domáceas, em troncos, espinhos e outras

estruturas. (Campbell et al. 2015). Estas domáceas são usadas como sítios de nidificação por formigas que defendem seu território, afastando herbívoros que possam causar injúrias à planta (Heil & McKey 2003). Se as plantas mirmecófitas disponibilizarem sítios de nidificação menores serão parceiras de menor qualidade para as formigas mutualistas e por isso devem ser menos atrativas para parceiros disponíveis no ambiente que plantas que disponibilizam sítios de nidificação maiores (Fonseca 1993).

Muito do que sabemos sobre variações no saldo de mutualismos facultativos e generalizados vem de estudos que tem focado em um único sistema de interação e que tem abordado a influência de fatores bióticos ou abióticos de forma isolada (e.g. Fitzpatrick et al. 2014, Heil 2013, Jones & Koptur 2015, Leal & Peixoto 2016). Contudo, a maioria das espécies pode participar simultaneamente de diferentes mutualismos e a sua aptidão deve ser, então, determinada pelo balanço do benefício líquido de todos os mutualismos dos quais elas fazem parte (Hoeksema & Bruna 2000). Isto ocorre porque o saldo de um determinado mutualismo para um indivíduo pode limitar a quantidade de benefício líquido que ele pode receber de um outro mutualismo do qual esse mesmo mutualista faça parte (Pringle 2015). Por exemplo, algumas plantas participam de interações simbióticas com fungos (Bonfante & Genre 2010). Neste caso, as plantas ganham com aumento da nutrição mineral, absorção de água e resistência a patógenos e fornecem nutrição para os fungos (Bonfante & Genre 2010). Porém, estas mesmas plantas podem fazer parte de outros mutualismos, como por exemplo mutualismo de defesa. Se os fungos mutualistas não desempenharem um bom serviço de absorção de nutrientes, a planta, ao pagar o custo de carbono associado à manutenção da interação com fungos micorrizos, pode compensar com diminuição de alocação de recursos para produção de nectários extraflorais, estruturas atrativas para os defensores (Laird & Addicott 2007). Por sua vez, tais plantas podem sofrer

um aumento de injúrias causadas por herbívoros, devido à redução do número de nectários extraflorais e, por consequência, redução na visita e/ou eficiência dos defensores atraídos por estas estruturas. Neste caso, a interação mutualista com os fungos, apesar de ser positiva quando vista de forma isolada, passa a ser mais custosa do que benéfica para a planta devido a redução da eficiência da defesa anti-herbivoria prestada por formigas.

Interação entre plantas portadoras de nectários extraflorais e formigas

Plantas possuem diversos mecanismos de defesa contra o ataque de herbívoros que podem ser classificados como mecanismos diretos e indiretos de defesa (para exemplos, veja Heil, 2010; Mello and Silva-filho, 2002). Existem dois tipos de mecanismos diretos: defesas físicas e defesas químicas (Mello & Silva-filho 2002). Defesas físicas e químicas são, respectivamente, modificações estruturais e produção de compostos secundários tóxicos ou repelentes que dificultam o acesso do herbívoro às plantas (Heil 2010, Lucas et al. 2000). Já defesas indiretas, ocorrem quando a planta disponibiliza recursos, como por exemplo corpos alimentares (partículas ricas em lipídios) e nectários extraflorais, que são atrativos de predadores de herbívoros (Bronstein 1994). Estes mecanismos indiretos de defesa são um tipo de mutualismo de defesa (Bronstein *et al*, 2006).

Cerca de 3825 espécies de plantas, distribuídas em 807 gêneros de 110 famílias possuem nectários extraflorais (Weber & Keeler, 2015). Nectários extraflorais são estruturas secretoras de néctar, que podem variar tanto em abundância, quanto em distribuição em uma planta durante seu desenvolvimento (Marazzi *et al.*, 2013). Estas estruturas podem estar localizadas em partes vegetativas, como folhas e estípulas, próximos

à inflorescência e em estruturas florais externas, que não são diretamente ligadas à polinização (Marazzi *et al.*, 2013). O néctar extrafloral secretado por algumas espécies de plantas pode conter açúcares, aminoácidos, proteínas, e pequenas quantidades de outros compostos (Bentley 1977). Grande variedade de artrópodes são atraídos pela composição nutritiva do néctar extrafloral, dentre eles uma ampla gama de espécies de formigas (Davidson *et al.*, 1989; de la Fuente & Marquis, 1999; Ness, 2006). Especificamente para formigas, o néctar extrafloral é um valioso recurso alimentar por, pelo menos, duas razões: (1) são fontes alimentares persistentes e de fácil localização no ambiente e (2) os monossacarídeos, dissacarídeos e pequenas quantidades de aminoácidos encontrados no néctar extrafloral servem de combustíveis para mantê-las ativas (Marazzi *et al.* 2013). Ao forragearem sobre a planta, atraídas pelo néctar extrafloral, formigas podem espantar potenciais consumidores de flores, folhas, frutos e sementes (Ness *et al.*, 2009). Neste caso, plantas e formigas formam uma interação mutualista de defesa onde formigas se beneficiam diretamente do néctar extrafloral ofertado pelas plantas e, indiretamente, dos herbívoros encontrados sobre elas e as plantas se beneficiam da proteção contra herbívoros que a formiga fornece (Bentley, 1977; Ness *et al.*, 2009).

No mutualismo entre formigas e plantas portadoras de NEFs, as formigas gastam energia ao patrulhar a planta e nas investidas contra herbívoros, além do risco de serem predadas durante o forrageio (Urban & Richardson 2015). Já as plantas gastam energia na produção do néctar extrafloral (Holland *et al.*, 2009; Rutter & Rausher, 2004). É comumente postulado que a produção de néctar extrafloral é relativamente pouco custosa para as plantas (Katayama & Suzuki 2011, O'Dowd 1980). Contudo, o investimento na produção de néctar extrafloral pode afetar negativamente o investimento na produção de néctar floral (Dutton *et al.*, 2016). Assim, o néctar floral passaria a ser produzido em menor quantidade,

ocasionando uma demanda conflitante entre o investimento dessas plantas em defesa anti-herbivoria e em polinização (Dutton et al. 2016). Além deste custo indireto via fisiologia da planta, há custos indiretos causados pela perda de estruturas florais e foliares via herbivoria, caso as formigas atendentes não sejam eficientes (Miller, 2007; Ness, 2006). Redução na eficiência de defesa anti-herbivoria prestada pelas formigas ainda pode levar uma redução na captação de carbono pelas plantas via redução da área fotossinteticamente ativa das plantas hospedeiras (Pringle 2015). Isso pode reduzir ainda mais a quantidade de energia que a planta pode alocar para outras funções, incluindo outros mutualismos.

Além das interferências indiretas que os mutualismos de proteção podem impor a polinização, existem também interferências diretas, já que estudos indicam que a presença de formigas podem afastar não apenas herbívoros, mas também polinizadores eficientes (Assunção et al. 2014). De maneira geral, sabemos que a presença de formigas em plantas interfere na ação de polinizadores, afastando-os, seja pelo número de formigas presentes na planta, por investidas agressivas das formigas contra polinizadores ou pela deposição de pistas químicas que servem de evidência da presença da formiga para os polinizadores (independente se a formiga já não está mais presente) (Dáttilo et al., 2015; Dutton et al., 2016; Hernandez-cumplido et al., 2016; Junker & Chung, 2007; Levan et al., 2014; Ness, 2006; Ohm & Miller, 2014; Tsuji et al., 2004). Adicionalmente, um fator que pode levar ao aumento da interferência das formigas na polinização das plantas portadoras de nectários extraflorais é a identidade da formiga presente na planta (LeVan et al., 2014; Ness, 2006; Tsuji et al., 2004). Quanto mais agressiva, mais eficiente a formiga tende a ser na defesa da planta contra herbívoros (Ness *et al*, 2006). Contudo, tal agressividade também pode estar diretamente relacionada com a intensidade com que essas formigas interferem na interação entre a planta e seus polinizadores. Nesse caso, interagir com formigas que são melhores

defensoras contra herbívoros traria custos adicionais para a planta, já que a diminuição de visitas de polinizadores poderia influenciar negativamente o número de flores polinizadas, bem como a produção de frutos e/ou sementes e, conseqüentemente o sucesso reprodutivo da planta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Assunção MA, Torezan-silingardi HM, Del-claro K. 2014. Do ant visitors to extrafloral nectaries of plants repel pollinators and cause an indirect cost of mutualism? *Flora*. 209:244–49
- Bentley BL. 1977. Extrafloral nectaries and protection by pugnacious bodyguards. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 8:408–27
- Betts MG, Hadley AS, Kress WJ. 2015. Pollinator recognition by a keystone tropical plant. *Ecology*. 112(11):3433–38
- Bonfante P, Genre A. 2010. Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nat. Commun.* 1:1–11
- Bronstein JL. 1994. Conditional outcomes in mutualistic interactions. *Trends Ecol. Evol.* 9(6):214–17
- Bronstein JL. 2001. The exploitation of mutualisms. *Ecol. Lett.* 4(3):277–87
- Bronstein JL, Alarcón R, Geber M. 2006. The evolution of plant – insect mutualisms. *New Phytol.* 172:412–28
- Bull JJ, Rice WR. 1991. Distinguishing Mechanisms for the Evolution of Co-operation. *J. Theor. Biol.* 149:63–74
- Campbell H, Fellowes MDE, Cook JM. 2015. The Curious Case of the Camelthorn: Competition, Coexistence, and Nest-Site Limitation in a Multispecies Mutualism. *Am. Nat.* 186(6):E172–81
- Dáttilo W, Aguirre A, Flores-Flores R V., Fagundes R, Lange D, et al. 2015. Secretory activity of extrafloral nectaries shaping multitrophic ant-plant-herbivore interactions in an arid environment. *J. Arid Environ.* 114:104–9
- Davidson DW, Snelling RR, Longino JT. 1989. Competition Among Ants for Myrmecophytes and the Significance of plant Trichomes. *Biotropica*. 21(1):64–73
- de la Fuente AM, Marquis RJ. 1999. The role of ant-tended extrafloral nectaries in the protection and benefit of a Neotropical rainforest tree. *Oecologia*. 188:192–202
- Dressler RL. 1968. Pollination by Euglossine Bees. *Evolution (N. Y.)*. 22(1):202–10
- Dunn DW, Jandér KC, Lamas AG, Pereira RAS. 2014. Mortal combat and competition for oviposition sites in female pollinating fig wasps. *Behav. Ecol.* 26(1):262–68
- Dutton EM, Luo EY, Cembrowski AR, Shore JS, Frederickson ME. 2016. Three 's a Crowd : Trade-Offs between Attracting Pollinators and Ant Bodyguards with Nectar Rewards in *Turnera*. *Am. Nat.* 188(1):38–51
- Ferrière R, Bronstein JL, Rinaldi S, Law R, Gauduchon M. 2002. Cheating and the evolutionary stability of mutualisms. *Proc. Biol. Sci.* 269(1493):773–80

- Fitzpatrick G, Lanan MC, Bronstein JL. 2014. Thermal tolerance affects mutualist attendance in an ant-plant protection mutualism. *Oecologia*. 176:129–38
- Fonseca CR. 1993. Nesting Space Limits Colony Size of the Plant-Ant *Pseudomyrmex concolor*. *Oikos*. 67:473–82
- Foster KR, Wenseleers T. 2006. A general model for the evolution of mutualisms. *J. Evol. Biol.* 19(4):1283–93
- Gaume L, McKey D, Anstett M-C. 1997. Benefits conferred by "timid" ants: active anti-herbivore protection of the rainforest tree *Leonardoxa africana* by the minute ant *Petalomyrmex phylax*. *Oecologia*. 112:209–16
- Heil M. 2010. Plastic defence expression in plants. *Evol. Ecol.* 24:555–69
- Heil M. 2013. Let the best one stay: Screening of ant defenders by *Acacia* host plants functions independently of partner choice or host sanctions. *J. Ecol.* 101:684–88
- Heil M, McKey D. 2003. Protective ant-plant interactions as model systems in ecological and evolutionary research. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 34:425–53
- Hernandez-Cumplido J, Forter B, Moreira X, Heil M, Berney B. 2016. Induced Floral and Extrafloral Nectar Production Affect Ant-pollinator Interactions and Plant Fitness. *Biotropica*. 48(3):342–48
- Hoeksema JD, Bruna EM. 2000. Pursuing the big questions about interspecific mutualism: a review of theoretical approaches. *Oecologia*. 125:321–30
- Holland JN, Chamberlain SA, Horn KC. 2009. Optimal defence theory predicts investment in extrafloral nectar resources in an ant – plant mutualism. *J. Ecol.* 97:89–96
- Holland JN, Deangelis DL. 2010. A consumer-resource approach to the density-dependent population dynamics of mutualism. *Ecology*. 91(5):1286–95
- Horvitz CC, Schemske DW. 1984. Effects of ants and an ant-tended herbivore on seed production of a Neotropical Herb. *Ecology*. 65(5):1369–78
- Janzen DH. 1966. Coevolution of Mutualism Between Ants and Acacias in Central America
- Janzen DH. 1979. How to be a fig. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 10:13–51
- Jones EI, Bronstein JL, Ferrière R. 2012. The fundamental role of competition in the ecology and evolution of mutualisms. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1256(1):66–88
- Jones IM, Koptur S. 2015. Quantity over quality: Light intensity, but not red/far-red ratio, affects extrafloral nectar production in *Senna mexicana* var. *chapmanii*. *Ecol. Evol.* 5(18):4108–14
- Junker R, Chung ÆAYC. 2007. Interaction between flowers, ants and pollinators: additional evidence for floral repellence against ants. *Ecol. Res.* 22:665–70

- Katayama N, Suzuki N. 2011. Anti-herbivory defense of two *Vicia* species with and without extrafloral nectaries. *Plant Ecol.* 212:743–52
- Laird RA, Addicott JF. 2007. Arbuscular mycorrhizal fungi reduce the construction of extrafloral nectaries in *Vicia faba*. *Oecologia.* 152:541–51
- Leal LC, Peixoto PEC. 2016. Decreasing water availability across the globe improves the effectiveness of protective ant – plant mutualisms : a meta-analysis. *Biol. Rev.* 1–10
- Leigh Jr EG. 2010. The evolution of mutualism. *J. Evol. Biol.* 23:2507–28
- LeVan KE, Lou K, Hung J, Mccann KR, Ludka JT, Holway DA. 2014. Floral visitation by the Argentine ant reduces pollinator visitation and seed set in the coast barrel cactus , *Ferocactus viridescens*. *Oecologia.* 174:163–71
- Lucas PW, Turner IM, Dominy NJ, Yamashita N. 2000. Mechanical Defences to Herbivory. *Ann. Bot.* 86:913–20
- Marazzi B, Bronstein JL, Koptur S. 2013. The diversity, ecology and evolution of extrafloral nectaries: Current perspectives and future challenges. *Ann. Bot.* 111(6):1243–50
- Mello MO, Silva-filho MC. 2002. Plant-insect interactions : an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. *Brazilian J. Physiol.* 14(2):71–81
- Meunier L, Dalecky A, Berticat C, Gaume L, Mckey D. 1999. Worker size variation and the evolution of an ant-plant mutualism : Comparative morphometrics of workers of two closely related plant-ants , *Petalomyrmex phylax* and *Aphomomyrmex afer* (Formicinae). *Insectes Soc.* 46:171–78
- Miller TEX. 2007. Does having multiple partners weaken the benefits of facultative mutualism? A test with cacti and cactus-tending ants. *Oikos.* 116(3):500–512
- Ness JH. 2006. A mutualism \hat{c}^{TM} s indirect costs : the most aggressive plant bodyguards also deter pollinators. *Oikos.* 113:506–14
- Ness JH, Morris WF, Bronstein JL. 2006. Integrating quality and quantity of mutualistic service to contrast ant species protecting *Ferocactus wislizeni*. *Ecology.* 87(4):912–21
- Ness JH, Morris WF, Bronstein JL. 2009. For ant-protected plants, the best defense is a hungry offense. *Ecology.* 90(10):2823–31
- O'Dowd DJ. 1980. Pearl Bodies of a Neotropical Tree , *Ochroma pyramidale*: Ecological Implications. *American.* 67(4):543–49
- Ohm JR, Miller TEX. 2014. Balancing anti-herbivore benefits and anti-pollinator costs of defensive mutualists. *Ecology.* 95(10):2924–35
- Pringle EG. 2015. Integrating plant carbon dynamics with mutualism ecology. *New Phytol.* (1):71–75

- Rudgers JA, Strauss SY. 2004. A selection mosaic in the facultative mutualism between ants and wild cotton. *R. Soc.* 271:2481–88
- Rutter MT, Rausher MD. 2004. Natural selection on extrafloral nectar production in *Chamaecrista fasciculata*: the costs and benefits of a mutualism trait. *Evolution (N. Y.)*. 58(12):2657–68
- Stanton ML. 2003. Interacting guilds: moving beyond the pairwise perspective on mutualisms. *Am. Nat.* 162(4):S10–23
- Thompson JN. 1988. Variation in Interspecific Interactions. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 19:65–87
- Tsuji K, Hasyim A, Nakamura K. 2004. Asian weaver ants, *Oecophylla smaragdina*, and their repelling of pollinators. *Ecol. Res.* 19:669–73
- Urban MC, Richardson JL. 2015. The Evolution of Foraging Rate across Local and Geographic Gradients in Predation Risk and Competition. *Am. Nat.* 186(1):16–32
- Warren RJ, Bradford MA. 2014. Mutualism fails when climate response differs between interacting species. *Glob. Chang. Biol.* 20:466–74
- Weber, M.G., Porturas, L.D., and K.H. Keeler, 2015. World list of plants with extrafloral nectaries. www.extrafloralnectaries.org. [07/03/2017].

Capítulo único

Manuscrito a ser submetido para o periódico *Oecologia*

Minha planta, minhas regras: influência de formigas nas visitas de polinizadores e na reprodução de plantas portadoras de nectários extraflorais

Anna Thiciane Freitas Santos¹ & Laura Carolina Leal de Sousa^{1,2}

¹ Laboratório de Entomologia, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana. Av. Transnordestina, s/n, Novo Horizonte, 44036-900, Bahia, Brasil. ² Departamento de Ecologia Evolutiva, Universidade Federal de São Paulo. Rua Conceição, 215, 09972-270, Diadema, Brasil.

INTRODUÇÃO

Espécies podem estar envolvidas em diversos mutualismos de forma simultânea (Bronstein 1994). Neste caso, o saldo de cada interação mutualista é variável de acordo com o contexto no qual a interação está inserida (Bronstein 2001), já que tantos os custos como os benefícios obtidos pelas espécies envolvidas nessas interações não são fixos, podendo variar tanto espacial quanto temporalmente (Chamberlain et al. 2014). Assim, mutualismos podem se tornar comensalismos (Lee et al. 2009) ou até mesmo antagonismos (Cheney and Côte 2005). Entre as forças que podem afetar o saldo de interações mutualistas, estão outras interações mutualistas que ocorrem simultaneamente em um mesmo sistema. De maneira geral, espécies estão envolvidas em diversos mutualismos de forma simultânea, sendo o saldo de cada um desses mutualismos variáveis de acordo com o contexto no qual a interação está inserida (Bronstein 1994). Dessa forma, se queremos entender o benefício de cada parceiro mutualista na aptidão destes indivíduos, é necessário

avaliar como cada parceiro afeta cada uma das interações mutualistas que ocorrem no sistema.

A polinização é um dos mutualismos mais importantes e mais estudados que ocorrem entre plantas e animais (Revilla and Encinas-Viso 2015). Juntos, angiospermas e polinizadores formam um dos maiores grupos de organismos em interação, sustentando boa parte das cadeias ecológicas em diversos ecossistemas (Waser et al. 1996). Por esse motivo, a polinização é um exemplo de processo ecológico que afeta diretamente o sucesso reprodutivo das plantas, o funcionamento das cadeias tróficas e, em última instância, a manutenção de espécies tanto vegetais, como animais (Wunderle 1997; Machado and Lopes 2004). De maneira geral, as principais pressões seletivas sobre as estratégias de polinização decorrem do ambiente no qual as plantas ocorrem, da competição entre as espécies de plantas que dependem dos mesmos polinizadores, da percepção de estímulos por polinizadores e da estabilidade climática (Opler et al. 1980; Howe and Smallwood 1982; Drezner et al. 2001; Chittka and Raine 2006). Contudo, outras interações positivas das quais a planta faça parte também podem influenciar no funcionamento e no saldo final da polinização. Isto porque todos os mutualismos do qual uma planta faz parte dependem da quantidade de energia que plantas têm para alocar entre suas diversas atividades (Pringle 2015). Neste caso, as características e o resultado final desses outros mutualismos podem afetar direta ou indiretamente a quantidade de recursos que plantas podem alocar para produção de flores e frutos ou mesmo afetar a atratividade da planta para os seus polinizadores (Wagner and Kay 2002; Heil and McKey 2003).

Uma das interações com outras espécies que podem afetar a polinização é o mutualismo de defesa entre plantas e formigas. Em algumas espécies de plantas, é comum encontrar estruturas secretoras de néctar chamadas de Nectários Extraflorais (NEFs, daqui

em diante), que podem estar localizadas em folhas, pecíolos, ramos, estípulas ou próximas às partes reprodutivas (Oliveira and Oliveira-Filho 1991). O néctar secretado por essas glândulas atrai formigas que, ao forragearem sobre a planta, removem ou espantam herbívoros que poderiam consumir tecidos foliares, florais ou até mesmo os frutos e sementes (Bentley, 1977; Janzen, 1966). Por serem estruturas muito acessíveis, os NEF'S atraem uma ampla gama de espécies de formigas que diferem entre si em comportamento e, potencialmente, quanto a sua capacidade de proteção da planta (Horvitz and Schemske 1984; Bronstein 2001). Esta diferença está marcada hierarquicamente, de acordo com a habilidade de monopólio de recursos e com variações na agressividade com que monopolizam o recurso (Cerdá *et al.*, 2013). Espécies dominantes são aquelas que apresentam alta habilidade competitiva, devido à alta agressividade ou capacidade de forragear em grupo, monopolizando o recurso frente a outras espécies de formigas (Hölldobler *et al.*, 1990). Já espécies subordinadas são aquelas que apresentam menor habilidade competitiva, seja pela baixa agressividade ou comportamento de forrageio (Parr, 2008). De maneira geral, espera-se que a proteção anti-herbivoria seja melhor quanto mais agressiva for a espécie de formiga (Palmer and Brody 2007; Xu and Chen 2010). Portanto, a interação frequente das plantas com esse defensor de maior qualidade aumentaria o sucesso reprodutivo da planta, via redução mais acentuada da herbivoria, quando comparada com uma espécie de formiga menos agressiva (Djiéto-Lordon *et al.* 2004). Contudo, estudos prévios mostraram que formigas que visitam nectários podem também reduzir o sucesso reprodutivo da planta, uma vez que as formigas atraídas pelo néctar extrafloral podem afastar tanto herbívoros quanto potenciais polinizadores (Wagner and Kay 2002; Heil and McKey 2003). Diferentes polinizadores podem ter diferentes tolerâncias às formigas. Neste caso, a simples presença da formiga na planta, já pode ser

um fator de interferência negativa na polinização, caso os polinizadores sejam animais visualmente orientados (Dáttilo et al., 2016). Contudo, também é possível que essa interferência negativa seja modulada pela identidade das formigas (Levan et al., 2014; Ness et al. 2006; Tsuji et al., 2004). Formigas mais agressivas não são mais agressivas apenas contra os herbívoros encontrados sobre as plantas, mas também podem atuar agressivamente contra polinizadores que se aproximem das plantas. Assim, a interferência das formigas na polinização de plantas portadoras de NEFs deve ser maior quanto mais agressiva for a espécie de formiga atendente, especialmente em plantas onde os nectários extraflorais estão próximos às peças florais. Se isso for verdade, o aumento da eficiência de defesa anti-herbivoria das plantas pela interação com formigas mais agressivas pode ter um efeito negativo sobre a produção de flores e frutos do indivíduo, uma vez que prejudicaria o serviço de polinização de suas flores.

Neste trabalho, buscamos responder duas perguntas: (1) de que maneira formigas que atendem nectários extraflorais localizados próximos às flores interferem na composição de polinizadores e na eficiência de polinização das plantas que possuem essas estruturas de defesa anti-herbivoria? (2) Como o comportamento das formigas atendentes dos NEFs podem afetar a composição de polinizadores e a eficiência de polinização das plantas portadoras dessas estruturas de defesa anti-herbivoria? Para responder tais perguntas, observamos interações entre as formigas que visitam os NEFs da planta *Turnera subulata* Smith (Turneraceae), e os polinizadores desta planta. Elaboramos duas hipóteses para a primeira pergunta: (H1) a presença de formigas atendendo os NEFs altera o conjunto de espécies de polinizadores que visitam as flores e (H2) a presença de formigas interfere negativamente na eficiência de polinização dessas flores. Para a segunda pergunta, também formulamos duas hipóteses: (H3) a composição de polinizadores muda de acordo com a

agressividade das formigas que atendem nectários extraflorais e (H4) quanto maior a agressividade das formigas que atendem os nectários, maior será a sua influência negativa no sucesso de polinização das flores.

MATERIAIS E MÉTODOS

- Local e modelo de estudo

Desenvolvemos o trabalho no campus da Universidade Estadual de Feira de Santana, localizada no município de Feira de Santana - Bahia (12° 58'S, 38° 50'W) entre fevereiro e abril de 2016. Dentro do *campus* é possível encontrar áreas remanescentes de Caatinga onde ocorrem predomínio da herbácea *Turnera subulata*, espécie que utilizamos como modelo de estudo. Os indivíduos de *T. subulata* apresentam heterostilia (Swamy and Bahadur 1984). A antese (abertura da flor) acontece no período da manhã, depois de receber a luz direta do sol, e o fechamento das flores por volta do meio-dia. O néctar floral produzido é de fácil acesso, não sendo necessárias adaptações morfológicas ou comportamentais para que os visitantes florais colem este recurso (Schlindwein and Medeiros 2006). A maturidade dos frutos é alcançada em torno de 8 a 10 dias após a fecundação (Schlindwein and Medeiros 2006). Esta espécie apresenta um par de NEFs na base da lâmina foliar, inseridos no pecíolo e na base das inflorescências (Barbosa et al. 2007). Estes NEFs são frequentemente visitados por diversas espécies de formigas que podem realizar defesa deste recurso (Arbo 2005; Melati 2016).

- Delineamento amostral

Inicialmente, buscamos 100 indivíduos de *T. subulata* que estivessem em período de floração. Selecionamos 20 indivíduos de *T. subulata* que não apresentassem formigas

atendentes no dia da observação. Quando não foi possível encontrar plantas que estivessem naturalmente sem formigas, selecionamos plantas que tivessem poucos indivíduos de formigas na sua superfície, removemos essas formigas manualmente e evitamos que outras formigas subissem nas plantas ao longo do período de observação. Selecionamos também 20 indivíduos de *T. subulata* atendidos pontualmente por uma dentre quatro espécies de formigas: *Camponotus blandus*, *Dorumyrmex piramicus*, *Ectatomma* sp. e *Solenopsis* sp. Escolhemos estas espécies de formigas com base no trabalho de Melati (2016), que realizou um levantamento da agressividade da mirmecofauna nas mesmas áreas onde realizamos o nosso estudo. Para criar tal classificação de agressividade, Melati (2016) usou como base a frequência de comportamentos agonistas (empurrar, morder, perseguir ou liberar ácido fórmico) dos indivíduos de cada espécie de formiga ocorrente na área de estudo quando estavam explorando recursos alimentares com outras espécies de formigas. Sendo assim, as espécies que selecionamos são aquelas que são mais frequentemente encontradas nas plantas em nossa área de estudo e que formam um gradiente de agressividade: *Solenopsis* sp. como a formiga mais agressiva, seguida por *Ectatomma* sp., *Camponotus blandus* e *Dorumyrmex piramicus*. Utilizamos a identidade da formiga como indicativo de agressividade. Por fim, deste conjunto de 80 plantas atendidas por formigas, sorteamos 20. Neste sorteio, não levamos em conta a identidade da formiga atendente, pois o interesse era apenas avaliar a presença de qualquer espécie de formiga.

As flores abrem apenas uma vez, no começo da manhã (~07:00h), fechando de maneira assincrônica após um período de 3 a 5 h (obs. pessoal). Cada planta poderia ter mais de uma flor aberta no dia da observação. Por conta disto, consideramos todas as flores que abriram no dia da observação de cada planta escolhida. Deste modo, consideramos cada planta como um indivíduo focal. Como *T. subulata* cresce de forma adensada e pode

apresentar crescimento clonal, evitamos selecionar indivíduos que estivessem dentro de um mesmo adensamento. Além disso, já que os indivíduos de *T. subulata* poderiam diferir quanto ao tipo de flor, brevistila ou longistila, classificamos os indivíduos selecionados de acordo com o tipo de flor que apresentava. Após a seleção dos indivíduos focais, observamos que as plantas estavam distribuídas espacialmente em quatro áreas distantes cerca de 10 m entre si, e que diferiam em quantidade de plantas no período de floração e quantidade de *T. subulata*.

Para avaliar quais polinizadores interagiam com as plantas, observamos as flores de *T. subulata* entre 7 e 12:00h. Consideramos como polinizador todo animal que entrou em contato diretamente com as peças reprodutivas das flores, ignorando aqueles que entrassem em contato, por exemplo, apenas com pétalas, sépalas ou outras estruturas da planta. Cronometramos cada visita observada, considerando o início da visita o momento em que o animal entrou em contato com as estruturas reprodutivas e o final da visita, o momento em que o polinizador interrompeu esse contato, se distanciando das estruturas reprodutivas. Repetimos esses procedimentos em todas as visitas observadas até o momento em que as flores se fechavam naturalmente, impossibilitando a entrada de novos polinizadores. Fotografamos e/ou coletamos os polinizadores e, posteriormente, classificamos em três grandes grupos: abelhas, borboletas e vespas.

Para avaliar se as formigas atendendo nectários extraflorais interferiam no sucesso reprodutivo da planta, acompanhamos diariamente as flores marcadas por um período de 10 dias (período de formação e maturação dos frutos). Ao longo desse período, observamos o número de flores que viraram frutos e o número de frutos que chegaram ao final da maturação. Coletamos os frutos após este período e contamos o número de sementes produzidas.

- Análise de dados

Utilizamos PERMANOVA para avaliar se a composição de espécies de polinizadores que são atraídos pelas flores de *T. subulata* varia de acordo com a presença de formigas atendendo os nectários e com a agressividade dessas formigas. Para tanto, utilizamos matrizes de dissimilaridade com distância de Bray-Curtis construídas a partir de uma matriz quantitativa do número de visitas de cada espécie de polinizador nas flores de cada planta focal. Além disso, para verificar de que maneira a presença e a identidade das formigas atendendo os NEFs influenciam no número de visitas de espécies de diferentes grupos de polinizadores (abelhas, borboletas e vespas), utilizamos modelos lineares generalizados mistos (GLMM) com distribuição de Poisson. Utilizamos em cada modelo final a presença/ausência das formigas nas plantas ou a identidade da formiga atendendo os nectários como variável preditora fixa e o número de visitas de borboletas e abelhas como variáveis respostas. Além da presença de formigas na planta ou da identidade das formigas, outros fatores como diferentes dias de coleta, área onde as plantas se encontravam, número de flores observadas por indivíduo focal e tipo de flor (brevistila ou longistila) também poderiam influenciar na variabilidade contida em nossos dados. Por isso, avaliamos a interferência destas variáveis aleatórias a priori sob cada uma das nossas variáveis respostas, a fim de avaliar quais delas deveriam permanecer em nossos GLMMs. Para tanto, observamos a quantidade de variação dos nossos dados explicada por cada uma das variáveis. Permaneceram nos modelos gerais como variáveis aleatórias apenas as métricas que representavam o dia de coleta e a área de coleta, que foram as únicas variáveis que tiveram variação diferente de 0 nos testes. Comparamos cada modelo com o modelo nulo

(variável resposta em função de 1 mais as respectivas variáveis aleatórias) e calculamos o valor de p por razão de verossimilhança.

Para avaliar se a presença de formigas atendendo nectários extraflorais afetou o número de visitas de polinizadores, o tempo médio das visitas, a proporção de frutos formados e de sementes produzidas, utilizamos modelos lineares generalizados mistos (GLMM). Para a análise do número de visitas de polinizadores e do número de sementes produzidas, utilizamos distribuição de Poisson. Em todos os modelos, a presença/ausência de formigas atendentes como variável preditora e as áreas das plantas focais no local de estudo como fator aleatório. Já para as análises de número de visitas de polinizadores e de número de sementes produzidas, incluímos como aleatórias o tipo de flor (longistila ou brevistila) e o número de flores por indivíduo. Do mesmo modo, para avaliar se a identidade da formiga atendente afetou o número de visitas de polinizadores, o tempo médio das visitas, proporção de frutos formados e número de sementes produzidas, utilizamos GLMMs. Em todos os modelos, utilizamos a identidade das formigas atendentes como variável preditora e as áreas das plantas focais como fator aleatório. Para as duas análises do número de visitas de polinizadores e do número de sementes produzidas, utilizamos modelos com distribuição de Poisson, e incluímos o tipo de flor (longistila ou brevistila) e o número de flores por indivíduo como variáveis aleatórias. Seleccionamos os fatores aleatórios de todos os GLMMs e desenvolvemos os testes seguindo os mesmos critérios adotados nos modelos descritos no parágrafo anterior. Realizamos todos os testes no *software* R (R Development Core Team, 2015) usando os pacotes “vegan” (Oksanen *et al.* 2015) e “lme4” (Bates *et al.* 2015).

Se a presença da formiga afetar a composição de polinizadores de plantas com NEFs, esperamos que a composição de polinizadores seja diferente entre plantas com e sem

formigas. Do mesmo modo, se a identidade da formiga atendente afetar a composição de polinizadores de plantas com NEFs, esperamos que a composição de polinizadores seja diferente entre plantas visitadas por formigas mais e menos agressivas. Caso a presença da formiga atendendo NEFs interfira negativamente na polinização, esperamos encontrar (1) menor o número de visitas de polinizadores, (2) menor a duração média das visitas, (3) menor a proporção de frutos formados e (4) menor número de sementes produzidas em plantas que estão sendo atendidas que em que não estão sendo atendidas por formigas. Por fim, caso a identidade da formiga atendendo NEFs interfira negativamente na polinização, esperamos encontrar que, quanto maior o grau de agressividade da formiga que atende aos nectários, (1) menor o número de visitas de polinizadores, (2) menor a duração média das visitas, (3) menor proporção de frutos formados e (4) menor número de sementes produzidas.

RESULTADOS

Formigas atendentes e sua influência na composição de polinizadores

No nosso trabalho, observamos 2175 visitas de polinizadores. Destas, 145 foram realizadas por abelhas, durando, em média, $8,18 \pm 12,10$ s (\pm DP) e 2018 visitas de borboletas que duraram, em média, $6,95 \pm 5,75$ s. As 12 visitas restantes foram de vespas e tiveram duração média de $6,91 \pm 5,03$ s. Porém, como as visitas de vespas se concentraram apenas em dois indivíduos de *T. subulata*, não avaliamos a influência das formigas sobre a frequência de visitação deste grupo de polinizadores nestas plantas. Os indivíduos focais receberam, no mínimo, 2 visitas e, no máximo, 86 visitas de polinizadores. Em 15 indivíduos focais, formigas exibiram investidas agressivas diretos contra os polinizadores atraídos pelas flores. O conjunto de polinizadores que visitaram plantas onde havia

formigas atendendo os NEFs mudou em relação ao grupo de polinizadores que visitaram as plantas que não estavam sendo atendidas por formigas no momento da polinização (pseudo-F = 3,12; gl = 1; p = 0,02; Fig. 1.A). Da mesma forma, o conjunto de polinizadores que visitaram as flores de *T. subulata* mudou em função da agressividade das formigas atendentes dos NEFs no momento da polinização (pseudo-F = 3,21; gl = 3; p = 0,001; Fig. 1.B).

A presença de formigas nas plantas levou a uma redução de 85,5% (52 visitas) no número de visitas das flores por abelhas em comparação com as flores das plantas sem formigas atendendo NEFs ($\chi^2 = 6,6$; gl = 1; p = 0,01; Fig. 2). Porém, a presença das formigas nos NEFs não influenciou o número de visitas das flores por borboletas ($\chi^2 = 0,06$; gl = 1; p = 0,83). Nas plantas com formigas, o número de visitas por abelhas não foi influenciado pela identidade da formiga atendente ($\chi^2 = 0,34$; gl = 3; p = 0,95). Porém, a identidade da formiga influenciou o número de visitas de borboletas ($\chi^2 = 9,9$; gl = 3; p = 0,02). Plantas patrulhadas por *Ectatomma* sp. tiveram, em média, uma redução de 41,3% ($231,7 \pm 17,8$) no número de visitas de borboletas quando comparado com plantas patrulhadas pelas outras espécies de formigas (Fig. 3A).

Formigas atendentes e sua influência na produção de frutos e de sementes

As 2175 visitas de polinizadores que acompanhamos aconteceram em 146 flores e totalizaram 489 minutos de visitas observadas. Cada visita durou, em média, $7,03 \pm 6,37$ s. Do número total de flores observadas, 85,6% (125) se desenvolveram em frutos e, destes, 72% (90) chegaram à maturação. Por fim, contabilizamos 1237 sementes produzidas, uma média de $13,7 \pm 13,3$ sementes por fruto que chegou a maturação.

A presença de formiga nos indivíduos focais de *T. subulata* não influenciou nem o número total de visitas de polinizadores ($\chi^2 = 1,42$; gl = 1; p = 0,23), nem o tempo médio das visitas ($\chi^2 = 0,27$; gl = 1; p = 0,59). Da mesma forma, a presença de formiga nas plantas também não influenciou a proporção de frutos formados em *T. subulata* ($\chi^2 = 1,65$; gl = 1; p = 0,20), nem o número total de sementes produzidas ($\chi^2 = 1,96$; gl = 1; p = 0,16).

A identidade das formigas que atendiam os nectários extraflorais de *T. subulata* influenciou o número de visitas de polinizadores ($\chi^2 = 80,9$; gl = 3; p < 0,001; Fig. 4A). O tempo médio de visitas de polinizadores não foi afetado pela identidade da formiga presente na planta ($\chi^2 = 1,18$; gl = 3; p = 0,83). Contudo, a proporção de flores que viraram frutos foi afetada pela identidade da formiga ($\chi^2 = 15,364$; gl = 3; p = 0,002; Fig. 4B). Plantas atendidas por *Solenopsis* sp. tiveram menos flores que se tornaram frutos em comparação com plantas atendidas pelas demais espécies. Da mesma forma, plantas que tinham seus nectários atendidos por *Solenopsis* sp. foram as que produziram o menor número de sementes ($\chi^2 = 41,8$; gl = 3; p < 0,001; Fig. 4C).

DISCUSSÃO

Nossos resultados indicaram que a presença de formigas atendendo nectários extraflorais e variações na identidade das formigas que visitam essas plantas são capazes de alterar a composição de polinizadores de *T. subulata*. Diferenças na composição de polinizadores diante da presença de formigas nos nectários parecem estar atreladas a redução na visita de espécies de abelhas a plantas sendo atendidas por formigas. Já a identidade das formigas parece afetar a composição de polinizadores pela modificação na frequência de visita de borboletas, uma vez que espécies desse grupo de polinizadores evitaram visitar flores das plantas patrulhadas por *Ectatomma* sp., a segunda espécie mais

agressiva em nosso ranking de formigas atendentes. Apesar de termos observado que as mudanças na composição dos polinizadores foi governada mais fortemente pela ação da formiga *Ectatomma* sp., foram as plantas atendidas por *Solenopsis* sp. (espécie de formiga mais agressiva) que tiveram a menor proporção de frutos formados e o menor número de sementes produzidas em comparação com as plantas atendidas pelas demais espécies de formigas. Isso sugere que a interferência de *Ectatomma* sp. no número de visitas e na composição de polinizadores não tem um efeito negativo no sucesso reprodutivo das plantas. Contudo, as reduções do número de frutos formados e sementes produzidas em plantas atendidas por *Solenopsis* sp. sugerem que, mesmo sem afetar diretamente parâmetros ligados a polinização das plantas que atendem, essas formigas podem impor outros tipos de custos que podem afetar diretamente o sucesso reprodutivo das plantas que elas atendem.

Em nosso trabalho, utilizamos a identidade da formiga como indicativo de sua agressividade. Porém, essas espécies diferiram entre si quanto a outras características além do seu comportamento. Por exemplo, *Ectatomma* sp. era a segunda espécie de formiga mais agressiva em nosso ranking de formigas visitantes, mas, ao mesmo tempo, era a espécie de formiga com o maior tamanho corporal. *Solenopsis* sp., que era a espécie de formiga mais agressiva no nosso ranking, possui tamanho corporal similar ao de *Dorymyrmex piramicus*, espécie menos agressiva no nosso ranking. Assim como as demais formigas menos agressivas, não afetou a composição dos visitantes florais. Além do comportamento, o tamanho das espécies de formigas que atendem nectários extraflorais é um fator que também pode afetar a resposta de polinizadores e dispersores das plantas hospedeiras (Dáttilo et al. 2016, Assunção et al. 2014). Por este motivo, é mais provável que a redução no número de visitas por borboletas e a redução no número total de visitas de polinizadores

em plantas atendidas por *Ectatomma* sp. esteja relacionada ao tamanho desta espécie, que aumenta a sua chance de ser visualizada e evitada por potenciais polinizadores. Além do tamanho, o posicionamento de *Ectatomma* sp. nas plantas também é um fator que pode contribuir para que determinadas espécies de polinizadores evitem visitar flores em plantas atendidas por essas formigas. Comumente observamos indivíduos de *Ectatomma* sp. parados próximos às flores, enquanto indivíduos das outras espécies de formigas, mesmo que em maior número, estavam em movimento por toda planta, ou abaixo das flores. Assim, o tamanho da formiga, somado à sua localização na planta facilitariam a percepção dos polinizadores visualmente orientados, como é o caso de borboletas, que podem evitar essas flores a fim de minimizar a chance de serem atacados por essas formigas.

Plantas atendidas por *Solenopsis* sp. tiveram menor proporção de frutos formados e menor número de sementes produzidas. Porém, a presença desta espécie de formiga atendendo NEFs não esteve relacionada a diferenças na composição de polinizadores, nem no número e tempo médio das visitas recebidas. Sendo assim, não acreditamos que a menor produção de frutos e sementes em plantas atendidas por *Solenopsis* sp. seja resultado da agressividade dessa formiga frente aos polinizadores de *T. subulata*. É mais plausível inferirmos que o número de frutos e de sementes produzidos não tenham sido afetados pela polinização, mas sim pela influência dessas formigas a longo prazo em outros aspectos da biologia da planta. Das quatro áreas que observamos nossas plantas, encontramos *Solenopsis* sp. apenas em uma delas. As plantas atendidas por esta espécie de formiga tinham coloração amarelada, folhas caídas, flores menores e menos vistosas quando comparadas com as plantas atendidas por outras espécies, seja na única área onde encontramos *Solenopsis* sp., como nas demais áreas. Além disso, ninhos de *Solenopsis* sp. foram frequentemente encontrados próximos ou mesmo sob as plantas (observações

peçoais). Por serem muito territoriais e a interação planta-formiga ser espacialmente estruturada (Goryunov 2011), é possível que a observação pontual que fizemos (neste caso, o período de abertura da flor) seja representativa de uma associação mais frequente ao longo do tempo entre *T. subulata* e *Solenopsis* sp. nessa área. De fato, estudos prévios realizados por nosso grupo de pesquisa com esse mesmo sistema e nessa mesma área de estudo mostraram que plantas atendidas mais frequentemente por *Solenopsis* sp. produziram menos sementes que plantas frequentemente atendidas por outras espécies de formigas que ocorrem nesse ambiente (Melati 2016). Assim, podemos sugerir que esta maior frequência de interação com *Solenopsis* sp. traria maior custo energético para a manutenção de interação com as plantas, seja porque esta espécie de formiga pode manter um grande número de indivíduos forrageando sobre a planta e consumindo mais néctar extrafloral, ou pela presença das formigas próximas às raízes das plantas, dada a localização dos ninhos que observamos. Deste modo, interagir com *Solenopsis* sp. demandaria um custo adicional para a planta, que seria compensado na diminuição de energia investida na produção de frutos e sementes.

Por fim, nossos resultados indicam que diferentes espécies de polinizadores podem responder de diferentes maneiras à presença de formigas na planta. Isso indica que a presença desse mecanismo de defesa anti-herbivoria em plantas pode representar um custo adicional para os seus polinizadores. No caso de *T. subulata*, a resposta dos polinizadores a presença ou identidade da formiga atendente não esteve diretamente relacionada com variações na produção de frutos e de sementes, o que deve ser consequência de uma alta redundância na qualidade do serviço de polinização das diferentes espécies de polinizadores que visitam essa planta. Das quatro espécies de formigas utilizadas neste trabalho, apenas uma apresentou efeito sobre a produção de fruto e de sementes. Isto indica

um efeito fraco da formiga atendendo NEF sobre parâmetros reprodutivos da planta. Este efeito negativo fraco e restrito a uma espécie de formiga ajuda a explicar a existência tão comum de mutualismos generalizados. Neste caso, várias espécies de indivíduos interagindo pode compensar efeitos negativos que alguns destes indivíduos podem trazer ao parceiro, aumentando assim a chance de um saldo final positivo na interação. Este efeito pode ter surgido pelo contexto em que a interação está inserida ou, ao longo do tempo, através de evolução, suavizando efeitos negativos de parceiros de interação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arbo MM (2005) Estudios sistemáticos en Turnera (Turneraceae). III. Series Anomalae y Turnera. *Bonplandia* 14:115–318. doi: 0524-0476
- Barbosa DA, Silva KN, Agra MF (2007) Estudo farmacobotânico comparativo de folhas de Turnera chamaedrifolia Cambess. e Turnera subulata Sm. (Turneraceae). *Brazilian J Pharmacogn* 17:396–413. doi: 10.1590/S0102-695X2007000300016
- Barrett SCH (2002) Evolution of Sexthe Evolution of Plant Sexual Diversity. *Nat Rev Genet* 3:274–284. doi: 10.1038/nrg776
- Bentley BL (1977) and Protection Y Pugnacious Bodyguards. *Annu Rev Ecol Syst* 8:407–427.
- Bronstein JL (2001) The exploitation of mutualisms. *Ecol Lett* 4:277–287. doi: 10.1046/j.1461-0248.2001.00218.x
- Bronstein JL, Alarcón R, Geber M (2006) The evolution of plant – insect mutualisms. *New Phytol* 172:412–428. doi: 10.1111/j.1469-8137.2006.01864.x
- Chamberlain SA, Bronstein JL, Rudgers JA (2014) How context dependent are species interactions? *Ecol Lett* 17:881–890. doi: 10.1111/ele.12279
- Cheney KL, Côte IM (2005) Mutualism or parasitism ? The variable outcome of cleaning symbioses. *Biol Lett* 162–165. doi: 10.1098/rsbl.2004.0288
- Chittka L, Raine NE (2006) Recognition of flowers by pollinators. *Curr Opin Plant Biol* 9:428–435. doi: 10.1016/j.pbi.2006.05.002
- Dáttilo W, Aguirre A, Luna P, et al (2016) Trait-mediated indirect interactions of ant shape on the attack of caterpillars and fruits. *Anim Behav* 1–4. doi: 10.1098/rsbl.2016.0401
- Djiéto-Lordon C, Dejean A, Gibernau M, et al (2004) Symbiotic mutualism with a community of opportunistic ants: Protection, competition, and ant occupancy of the

- myrmecophyte *Barteria nigritana* (Passifloraceae). *Acta Oecologica* 26:109–116. doi:
10.1016/j.actao.2004.03.007
- Drezner TD, Fall PL, Stromberg JC (2001) Plant distribution and dispersal mechanisms at
the Hassayampa River Preserve, Arizona, USA. *Glob Ecol Biogeogr* 10:205–217. doi:
10.1046/j.1466-822x.2001.00216.x
- Goryunov DN (2011) Territorial Strategies in Ants. *Entomol Rev* 91:1491–1499. doi:
10.1134/S0013873811020096
- Heil M, McKey D (2003) Protective ant-plant interactions as model systems in ecological
and evolutionary research. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 34:425–453. doi:
10.1146/132410
- Horvitz CC, Schemske DW (1984) Effects of ants and an ant-tended herbivore on seed
production of a Neotropical Herb. *Ecology* 65:1369–1378. doi: 10.2307/1939117
- Howe HF, Smallwood J (1982) Ecology of Seed Dispersal. *Annu Rev Ecol Syst* 201–228.
doi: 10.1146/annurev.es.13.110182.001221
- Janzen DH (1966) Coevolution of Mutualism Between Ants and Acacias in Central
America. *Evolution* (N. Y). 20:249–275.
- Jones EI, Bronstein JL, Ferrière R (2012) The fundamental role of competition in the
ecology and evolution of mutualisms. *Ann N Y Acad Sci* 1256:66–88. doi:
10.1111/j.1749-6632.2012.06552.x
- Lee JH, Kim TW, Choe JC (2009) International Association for Ecology Commensalism or
Mutualism : Conditional Outcomes in a Branchiobdellid-Crayfish Symbiosis
Published by : Springer in cooperation with International Association for Ecology
Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/40309>. *Oecologia* 159:217–224. doi:
10.1007/s00442-008-

- Machado IC, Lopes AV (2004) Floral traits and pollination systems in the Caatinga, a Brazilian tropical dry forest. *Ann Bot* 94:365–376. doi: 10.1093/aob/mch152
- Melati BG (2016) Na dose certa: a frequência de interação entre pares de espécies modula a qualidade relativa dos indivíduos como parceiros mutualistas. Universidade Estadual de Feira de Santana
- Oliveira PS, Oliveira-Filho AT (1991) Distribution of extrafloral nectaries in the woody flora of tropical communities in western Brazil. In: *Plant-animal interactions: evolutionary ecology in tropical and temperate regions*. pp 163–175
- Opler PA, Frankie GW, Baker HG, et al (1980) Comparative Phenological Studies of Treelet and Shrub Species in Tropical Wet and Dry Forests in the Lowlands of Costa Rica. *J Ecol* 68:167–188. doi: 10.2307/2259250
- Palmer TM, Brody AK (2007) Mutualism as reciprocal exploitation: African plant-ants defend foliar but not reproductive structures. *Ecology* 88:3004–3011. doi: 10.1890/07-0133.1
- Pringle EG (2015) Integrating plant carbon dynamics with mutualism ecology. *New Phytol* 71–75. doi: 10.1111/nph.13679
- Revilla TA, Encinas-Viso F (2015) Dynamical transitions in a pollination-herbivory interaction: A conflict between mutualism and antagonism. *PLoS One* 10:1–18. doi: 10.1371/journal.pone.0117964
- Schlindwein C, Medeiros PCR (2006) Pollination in *Turnera subulata* (Turneraceae): Unilateral reproductive dependence of the narrowly oligolectic bee *Protomeliturga turnerae* (Hymenoptera, Andrenidae). *Flora Morphol Distrib Funct Ecol Plants* 201:178–188. doi: 10.1016/j.flora.2005.07.002
- Swamy NR, Bahadur B (1984) Pollen flow in dimorphic *Turnera subulata* (Turneraceae).

New Phytol 98:205–209.

Wagner D, Kay A (2002) Do extrafloral nectaries distract ants from visiting flowers? An experimental test of an overlooked hypothesis. *Evol Ecol Res* 4:293–305. doi: 10.1.1.4.2080

Waser NM., Chittka L, Price MV., et al (1996) Generalization in Pollination Systems , and Why it Matters. *Ecology* 77:1043–1060. doi: 10.2307/2265575

Wunderle JM (1997) The role of animal seed dispersal in accelerating native forest regeneration on degraded tropical lands. *For Ecol Manage* 99:223–235. doi: 10.1016/S0378-1127(97)00208-9

Xu FF, Chen J (2010) Competition hierarchy and plant defense in a guild of ants on tropical *Passiflora*. *Insectes Soc* 57:343–349. doi: 10.1007/s00040-010-0089-y

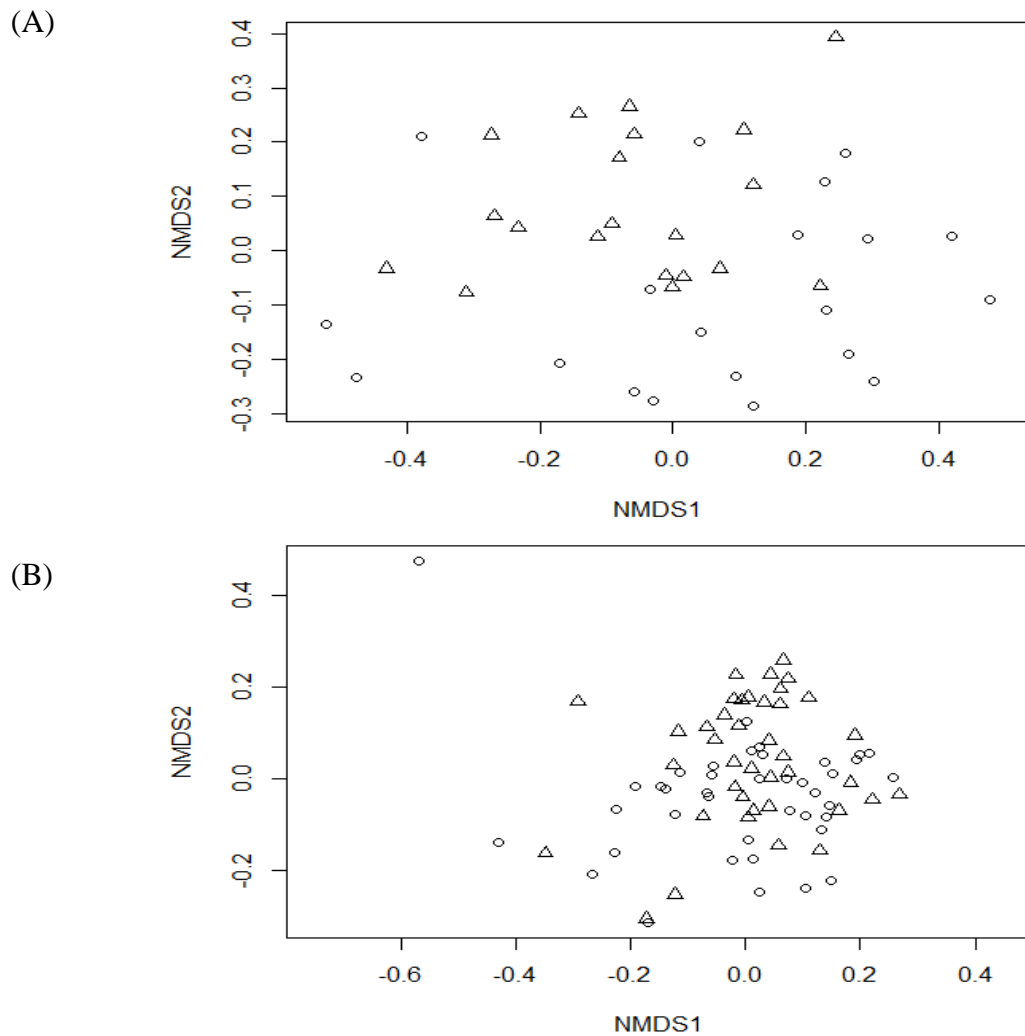


Figura 1. (A) Composição de polinizadores de *Turnera subulata* (Turneraceae) em plantas atendidas por formigas (representadas por círculos) e plantas não atendidas por nenhuma formiga (representadas por triângulos) (pseudo-F = 3,119; gl = 1; p = 0,021) e (B) em plantas atendidas por formigas mais agressivas (*Solenopsis* sp e *Ectatomma* sp, representadas por círculos) e menos agressivas (*Camponotus blandus* e *Dorymyrmex piramicus*, representadas por triângulos) (pseudo-F = 3,209; gl = 3; p = 0,001).

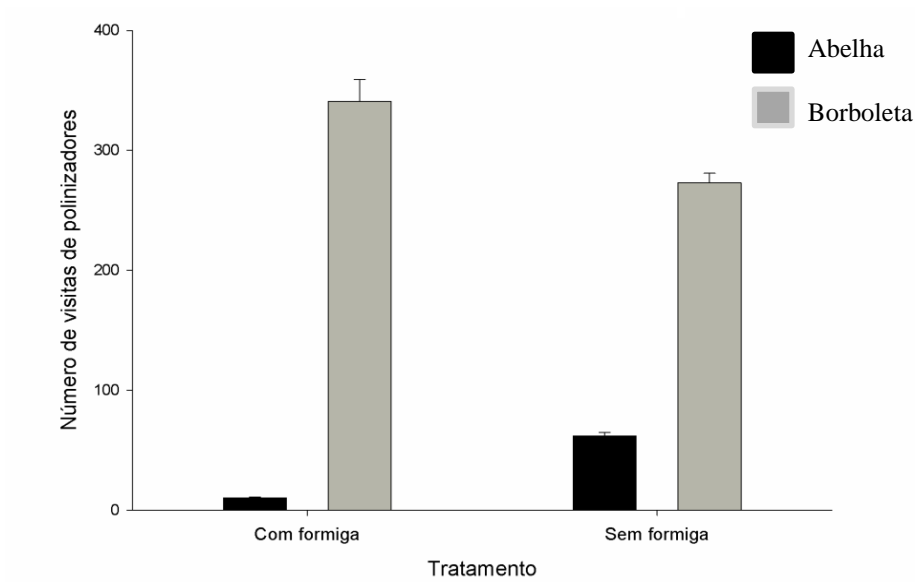


Figura 2. Número de visitas de abelhas e borboletas a flores de *Turnera subulata* (Turneraceae) que tem seus nectários extraflorais atendidos ou não por formigas ($\chi^2 = 6.6$; gl = 1; p = 0,01). Barras representam o desvio padrão.

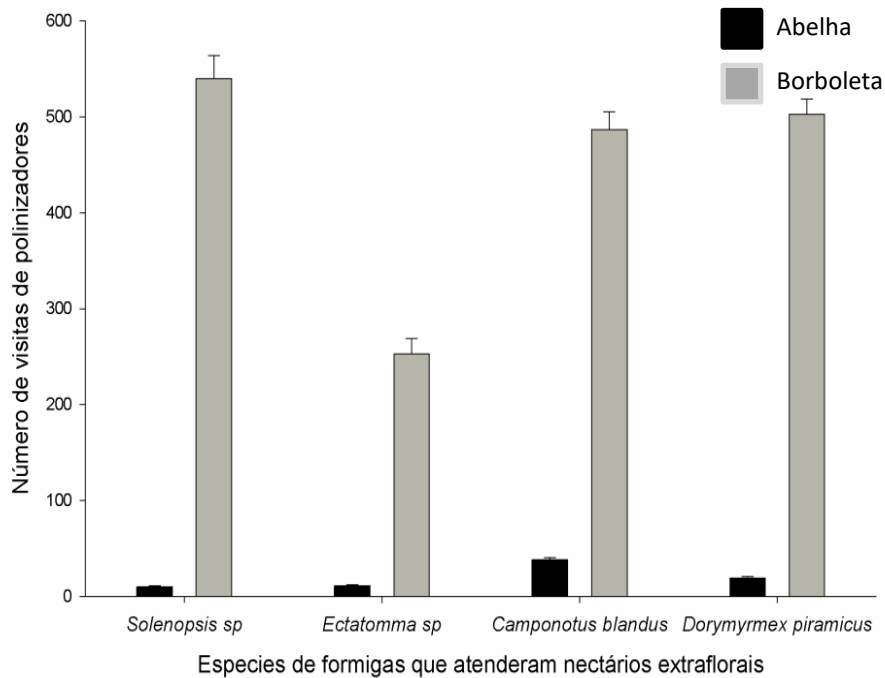


Figura 3. Número de visitas de abelhas e borboletas a flores de *Turnera subulata* (Turneraceae) que tem seus nectários extraflorais atendidos por diferentes espécies de formigas ($\chi^2 = 9,9$; gl = 3; p = 0,02). Barras representam o desvio padrão.

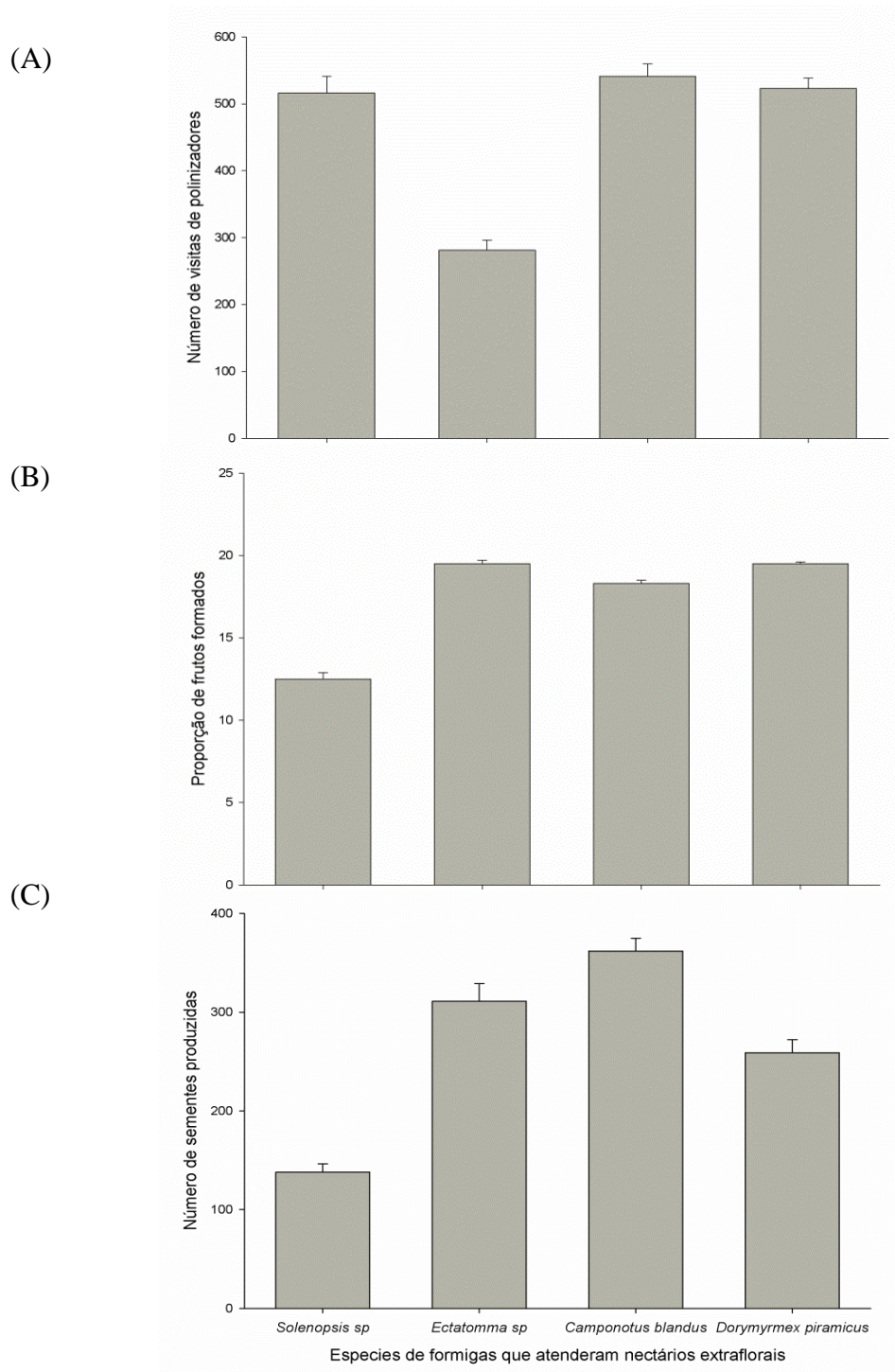


Figura 4. (A) Número de visitas de polinizadores ($\chi^2= 80,9$; gl= 3; $p< 0,001$); (B) proporção de frutos formados ($\chi^2= 15,364$; gl= 3; $p= 0,002$) e (C) número total de sementes produzidas ($\chi^2= 41,8$; gl= 3; $p< 0,001$) em plantas de *Turnera subulata* (Turneraceae) que tem seus nectários extraflorais atendidos por diferentes espécies de formigas. As barras estão apresentadas com desvio padrão associados.

Anexo

***Oecologia* Author Instructions – General**

[Aims and scope](#)

[Legal and ethical requirements](#)

[Manuscript submission](#)

[Manuscript preparation](#)

[Manuscript contents](#)

[After acceptance](#)

[Aims and scope](#)

Oecologia publishes innovative ecological research of general interest to a broad international audience. We publish several types of manuscripts in many areas of ecology:

Categories:

Physiological ecology
Behavioral ecology
Population ecology
Plant-animal interactions
Community ecology
Ecosystem ecology
Global change ecology
Conservation ecology

Manuscript Types:

Concepts, Reviews, and Syntheses
Views and Comments
Special Topics
Original Research Papers
Methods

In general, studies that are purely descriptive, mathematical, documentary, and/or natural history will not be considered.

In the *Concepts, Reviews and Syntheses* section, we seek papers on emerging issues in ecology, especially those that cross multiple boundaries in ecology, provide synthesis of important bodies of work or delve into new combinations of theory and observations with the potential to create new paradigms or challenge existing paradigms. These papers are usually invited, but we welcome unsolicited contributions. In the *Views and Comments* section we seek short papers with the intent to provide contrary and/or broader perspectives on papers recently published in *Oecologia*. Alternatively, pairs of short papers which present opposing views on a topic of high interest in the ecological research community will be published in this section, with the intent to stimulate open debate. In both cases, the papers must be relatively short (up to 5 printed pages in the case of opposing view pairs of papers, or up to 3 printed pages in the case of comments on previously-published work), and to contain not only an opinion or criticism on methods or statistics, but also relevant data or original analyses that support the opposing view or comment. Manuscripts or letters intended for the Views and Comments section will be reviewed by one of the Editors-in-Chief and a Handling Editor in the field appropriate to the submission. *Special Topics* are a collection of integrated papers on a critical topic of broad interest. Proposals for Special

Topics should be submitted to one of the Editors-in-Chief. *Methods* are papers that outline new approaches that address standing questions in the discipline. *Original Research Papers* provide the core of our journal and represent original investigations that offer new insights into ecological systems.

Oecologia Author Instructions – General, Page 1

Legal and ethical requirements

Submission of a manuscript implies that the work described has not been published before (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or thesis); that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities - tacitly or explicitly - at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation. In addition,

- Plagiarism will not be tolerated. All text should represent contributions of the authors unless material is quoted and attributed to its original source. Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers.
- All animal experiments must have been conducted in conformity with the “Guiding principles in the care and use of animals” approved by the Council of the American Physiological Society. Evidence of the adherence to these principles should be apparent
- All human studies must have been performed in accordance with the ethical standards of the 1964 Declaration of Helsinki and reviewed by the appropriate ethics committee. The text should clearly state that all persons gave their informed consent prior to their inclusion in the study. Details that might disclose the identity of the subjects should be omitted.
- Authors must include a declaration that experiments comply with the current laws of the country in which the experiments were performed
- Authors must indicate whether or not they have a financial relationship with the organization that sponsored the research. If no conflict exists, authors should state: The authors declare that they have no conflict of interest.

The Editors-in-Chief reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned requirements. The author(s) will be held responsible for false statements or for failure to fulfill the above-mentioned requirements.

Manuscript submission

Authors must submit their articles to "Oecologia" online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing, review and publication time. After passing a pre-review assessment for journal eligibility by an Editor-in-Chief and a Handling Editor, submitted manuscripts are subject to peer review and copy editing. Please log directly onto the link below and upload your manuscript following the on-screen instructions. For the review process, the manuscript may be submitted as one single file (PDF, Microsoft Word or Rich Text Format with embedded illustrations, tables, etc.). If the manuscript is accepted, original files (not pdf or html) of the final version of the manuscript must be uploaded for production. Online appendices (Electronic Supplementary Material, ESM) must be submitted in a separate file. There is a total

file size limit of 60 MB for a manuscript submission, including ESM. If ESM (e.g., video) exceeds this size, please contact the appropriate Editor-in-Chief directly.

[Submit Online](#)

[Manuscript preparation](#)

- The length of articles should not exceed 10 printed pages (equivalent to approximately 35 submitted pages) including all references, tables, figures, and figure legends. Views and Comments submissions must be limited to 3 to 5 printed pages. One printed page corresponds to approximately 3 submitted pages, 850 words text, or 3 illustrations with their legends, or 55 references. There will be a charge of 100 €, plus 19% VAT, for each page exceeding this limit. Editors typically return manuscripts prior to review that are likely to exceed the page limit.
- Manuscripts must be written in English and double-spaced throughout (including references) with at least 2.5 cm (1 inch) margins. Please write in the active voice using the past tense only for methods and results sections.
- Page numbers are required for the manuscript but should not be included on tables and figures. Pages in Electronic Supplementary Material (ESM) should be numbered separately.
- Line numbers for text should run consecutively throughout the text, from the title page through the figure legends. Do not number lines in tables or figures.
- Use a normal, plain font (e.g. Times New Roman) for text. Genus and species names should be in italics. The common names of organisms should not be capitalized
- Abbreviations should only be used for terms repeated at least 3 times. Abbreviations should be defined at first mention in the abstract and again in the main body of the text and used consistently thereafter.
- Format dates as day-month-year with months abbreviated: e.g., 01-Jan-2008
- Use the equation editor of a word processing program or MathType for equations. (Note: If you use Word 2007, do not create equations with the default equation editor but use the Microsoft equation editor or MathType instead.) Symbols for parameters should be *italicized*.
- Report values in equations, tables, figures and statistics with the number of digits that matches the precision of the data.
- Please always use Unicode (<http://www.unicode.org>) font for non-roman characters. Use internationally accepted signs and symbols following the Standard International System of Units (SI, <http://physics.nist.gov/cuu/Units/units.html>) throughout the manuscript (in the text, tables and figures). Avoid complex units wherever possible (e.g use “no. m⁻²” instead of “no. per 16 m²”). Units should use exponent notation and avoid multiplication and division symbols (e.g., “*”, “/”, “x”): i.e., “no. m⁻²” and not “no./m²”).
- Footnotes should not be used, except on the title page or in Tables.
- For indents, use tab stops or other commands, not the space bar.

Manuscript contents (in order)

- **Title page** The title should be concise and informative and less than 200 characters. Short titles (< 15 words) are best and are more often cited. The concept, problem or hypothesis to be tested should be clear from the title. The use of full taxonomic names in the title is discouraged; no taxonomic authorities should appear in titles. On the title page, include name(s) of author(s), the affiliation(s) of the author(s), and the e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author.
- **Abstract** The abstract should start with theory -based objectives or hypotheses, end with explicit conclusions, and should not exceed 250 words in length. Refrain from giving detailed methods; in most cases the technique becomes obvious by the way results are reported. Avoid writing “is discussed” or “needs further research”, and instead end with a conclusive statement of how the work has furthered our ecological understanding. The abstract should not contain any undefined abbreviations or literature references.
- **Key words** Five key words should be supplied, indicating the scope of the paper and not repeating terms already used in the title. Each keyword should not contain more than two compound words, preferably only one.
- **Introduction**
- **Materials and methods** Some submissions, such as reviews, may depart from the typical format of Methods-Results-Discussion.
- **Results** Avoid “Results are shown in Figure 3”. Instead, say for example, “Biodiversity declined with the addition of nitrogen (Fig. 3).” Be specific: e.g., “positively correlated” instead of “correlated”. Refer to magnitudes of effects (e.g. give effect sizes and confidence intervals) rather than just *P*-values.
- **Discussion**
- **Acknowledgements** Please keep this section as short as possible. Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full. Compliance with ethical standards may be stated in the cover letter rather than the acknowledgements section.
- **References** Literature citations in the text should be ordered chronologically and indicate the author's surname with the year of publication in parentheses, e.g. Carlin (1992); Brooks and Carlin (1992). If there are more than two authors, only the first author should be named, followed by "et al." For example, “Carlin (1992), Brooks and Carlin (2004, 2005), Jones et al. (2007) demonstrated...” OR “... well studied (Carlin 1992; Brooks and Carlin 2004, 2005; Jones et al. 2007)”. References at the end of the paper should be listed in alphabetical order by the first author's name. If there is more than one work by the same author or team of authors in the same year, a, b, etc. is added to the year both in the text and in the list of references. References should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Alphabetize the list of references by the last names of the first author of each work. If available, the Digital Object Identifier (DOI) of the cited literature should be added at the end of each reference. Always use the standard abbreviation of a journal's name

according to the ISSN List of Title Word Abbreviations (www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php). Reference examples:

Journal papers: name(s) and initial(s) of all authors; year; full title; journal title abbreviated in accordance with international practice; volume number; first and last page numbers

Savidge WB, Blair NE (2004) Patterns of intramolecular carbon isotopic heterogeneity within amino acids of autotrophs and heterotrophs. *Oecologia* 139:178-189. doi: 10.1007/s00442-004-1500-z

Chapter in a book: name(s) and initial(s) of all authors; year; title of article; editor(s); title of book; edition; volume number; publisher; place of publication; page numbers

Hobson KA (2003) Making migratory connections with stable isotopes. In: Berthold P, Gwinner E, Sonnenschein E (eds) *Avian migration*. Springer, Berlin, pp 379-391

Book: name and initial(s) of all authors; year; title; edition; publisher; place of publication

Körner C (2003) *Alpine plant life*, 2nd edn. Springer, Berlin

Theses: name and initial(s) of author; year; type (e.g., “Master thesis” or “PhD dissertation”), institution, place of publication

Wilson JA (2004) *Habitat quality, competition and recruitment processes in two marine gobies*. PhD dissertation, University of Florida, Gainesville

- **Tables** Each table should be submitted on a separate page, with the title (heading) above the table. Tables should be understandable without reference to the manuscript text. Restrict your use of tables to essential material. All tables must be cited in the manuscript text and numbered consecutively with Arabic numerals. Provide dimensions or units for all numbers. Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table heading. Tables will be printed with horizontal separation lines only (one below the table’s header, one below the column headers, and one at the end of the table); no vertical lines will be printed. Use tab stops to align columns and center numbers around decimals when appropriate. Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). The number of decimals presented should be sensible and match the precision of the data. Acceptable file formats for tables include Microsoft Word (.doc), Rich Text Format (.rtf) and Excel (.xls).
- **Figure legends** All figure legends (captions) should be assembled onto a separate page(s) preceding the figures. Each caption should be brief but sufficient to explain the figure without reference to the text. All figures must be cited in the manuscript text and numbered consecutively with Arabic numerals.

- **Figures** Each figure should appear on a separate page, with its figure number but without the figure legend. Figure preparation is critical. Please follow the journal-specific instructions and examples.
- **Electronic Supplemental Material (ESM)** ESM are on-line appendices and may consist of information that is more convenient in electronic form (e.g. sequences, spectral data); large quantities of original data that relate to the manuscript (e.g. maps, additional tables and illustrations); and any information that cannot be printed (animations, video clips, sound recordings). Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability. Figures embedded within the ESM text are fine. If spreadsheets are to be interactive, they should be submitted as .xls files (Microsoft Excel), otherwise submit as PDF. Always use MPEG-1 (.mpg) format for audio, video and animation. It is possible to submit multiple files in a .zip or .gz file. Name the ESM files consecutively, e.g. “ESM_3.mpg”. ESM must be numbered and referred to as “Online Resource”. The manuscript text must make specific mention of the ESM material as a citation, similar to that of figures and tables, e.g., “. . . as shown in the animation (Online Resource 3)”. ESM is not subject to copyediting and will be published as received from the author in the online version only so authors should format the ESM material exactly as they want it to appear. Do not include line numbers. ESM will be available in color at no additional charge. Reference to ESM will be included in the printed version.

[After acceptance](#)

- **MyPublication** Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer’s web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice and offprints. Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.
- **Open Choice** In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer’s online platform SpringerLink. We regret that Springer Open Choice cannot be ordered for published articles. Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. [Springer Open Choice](#)
- **Copyright transfer** Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws. See Springer’s “[Copyright information](#)” for more information.
 - Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, they agree to the Springer Open Choice Licence.
- **Offprints** Twentyfive reprints (offprints) of each contribution are supplied free of charge. Additional offprints can be ordered by the corresponding author via the MyPublication site.

- **Color illustrations** Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution of Euro 950 towards the extra costs.
- **Proof reading** The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. The corresponding author is informed by e-mail that a temporary URL has been created from which the proofs can be obtained. Authors can submit their proof corrections (formal corrections only) either online, via e-mail, or by fax. Substantial changes in content (e.g. new results, corrected values, title and authorship) are not allowed without the approval of the responsible editor. In such a case please contact the Editorial Office that handled the review before returning the proofs to the publisher.
After online publication, corrections can only be made in exceptional cases and in the form of an Erratum which will be hyperlinked to the paper. ESM will not be included in proofs (because ESM is not copy edited and will be made available exactly as it was provided by the authors).
- **Online First** The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

Oecologia

Editors-in-Chief: Ballaré, C.L.; Brandl, R.; Gross, K.L.;

Monson, R.K.; Trexler, J.C.; Ylönen, H.

ISSN: 0029-8549 (print version)

ISSN: 1432-1939 (electronic version)

Journal no. 442