



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus Botucatu



**INTERAÇÕES MULTITRÓFICAS: O EFEITO DE FORMIGAS, BESOUROS
E MARIPOSAS SOBRE A REPRODUÇÃO E A MORFOLOGIA FLORAL
DE *TOCOYENA FORMOSA* (RUBIACEAE)**

PRISCILA ANDRE SANZ VEIGA

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia, Câmpus de Botucatu, UNESP,
para obtenção do título de Mestre no
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas (Botânica), Área de concentração
Morfologia e Diversidade Vegetal.

**BOTUCATU – SP
2016**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

INTERAÇÕES MULTITRÓFICAS: O EFEITO DE FORMIGAS, BESOUROS
E MARIPOSAS SOBRE A REPRODUÇÃO E A MORFOLOGIA FLORAL
DE *TOCOYENA FORMOSA* (RUBIACEAE)

PRISCILA ANDRE SANZ VEIGA

PROF. Dr. FELIPE WANDERLEY AMORIM
ORIENTADOR

Dr. SANTIAGO BENITEZ-VIEYRA
COORIENTADOR

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia, Câmpus de Botucatu, UNESP,
para obtenção do título de Mestre no
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas (Botânica), Área de concentração
Morfologia e Diversidade Vegetal.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Veiga, Priscila Andre Sanz.

Interações multitróficas : o efeito de formigas, besouros e mariposas sobre a reprodução e a morfologia floral de *Tocoyena formosa* (Rubiaceae) / Priscila Andre Sanz Veiga. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Felipe Wanderley Amorim

Coorientador: Santiago Benitez-Vieyra

Capes: 20300000

1. Rubiaceae. 2. Cerrados. 3. Mutualismo. 4. Polinização. 5. Mariposa. 6. Flores - Morfologia. 7. Evolução (Biologia).

Palavras-chave: Cerrado; Esfingofilia; Mutualismo defensivo; Polinização; Seleção fenotípica.

Escrever a meu ver é sentir brincar
É dar ao pensamento asas para voar

Escrever é indiretamente conviver com o alheio
È tê-lo sempre junto como esteio

Escrever é criar versos em prosa de mística emoção
Que envolva o espírito e atinja a imaginação

Escrever é o imprevisível que se manifesta em realidade
Vem de nosso ego e levar para outros a felicidade

Escrever é uma situação que se inventa e se arrebenta
Como um furacão no centro da tormenta

Escrever é proporcionar ao leitor novos entretenimentos
È comunicar a todos agradáveis passa tempos

Enfim, o que é escrever?

È difícil de dizer, mas é fácil...

È só escrever o que você deseja que outros venham a conhecer

Mario Andre

Aos meus queridos avós Mario e Maria, exemplo do mais puro amor e felicidade. Estiveram presente em todos os momentos da minha vida. Infelizmente não puderam ficar para mais um capítulo. A eles, a minha querida Mãe e ao meu querido Pai dedico meu esforço e conquistas.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida durante o mestrado.

Ao CNPq pelo apoio financeiro no âmbito do Universal CNPq, processo: 484469/2013-14.

Aos proprietários da “Fazenda Palmeira da Serra” por permitir a realização do trabalho de pesquisa na reserva de Cerrado.

Em especial agradeço à minha amada mãe e ao meu namorado pela enorme ajuda com o trabalho de campo, por terem me escutado, entendido e apoiado, mesmo quando nem eu mesma me aguentava. Vocês foram fundamentais, sem vocês nada teria sido possível. Mãe sua ajuda foi essencial, seu amor, atenção e apoio me deram forças para continuar e enfrentar todas as dificuldades. Obrigada por todo carinho e principalmente pela paciência!

Ao meu guerreiro e inspirador pai, cuja dedicação e foco me inspiram e motivam cada dia. Obrigada pelo apoio, pelas valiosas discussões e contribuições filosóficas!

Ao professor Dr. Felipe W. Amorim pela orientação e oportunidade de mestrado. Muito obrigada pelos ensinamentos, dedicação, discussões, incentivo e, principalmente pela paciência!! Obrigada por compartilhar seu conhecimento e essa paixão pelas interações planta-animal.

Ao Dr. Santiago Benitez-Vieyra pela excelente coorientação, pela atenção, ensinamentos e indispensável contribuição.

Ao Dr. Leonardo Ré pela colaboração, atenção e essencial contribuição.

À Profa. Dra. Marlies Sazima, muito obrigada pelo carinho, incentivo e por ter aberto a primeira porta ao fascinante mundo da biologia da polinização.

A todos do laboratório de Biosistemática da Unicamp (Fer, Coquinho, Vini, André, Pietro, Pedro, Marina) obrigado pelos cursos oferecidos, pelos debates e pelo apoio. A dedicação desses alunos apaixonados pelo que fazem foi o estímulo fundamental para o meu mestrado.

Agradeço ao Dr. Rodrigo Feitosa da Universidade Federal do Paraná pela atenção e contribuição na identificação das formigas.

Ao Dr. Sérgio Vanin (Universidade De São Paulo) pela atenção e ajuda na identificação da espécie de curculionídeo.

Ao Dr. Sebastian e ao Javier (Unicamp), aos professores Dr. Rodrigo Medel, Dr. Luis Navarro, Dr. Wesley Dáttilo e Dr. Anselmo Nogueira pela atenção, considerações e sugestões que, de alguma forma, contribuíram para esse trabalho.

À Fer pela hospitalidade, carinho, atenção, pelo imprescindível apoio durante todo o meu mestrado!

À July pela ótima convivência, paciência e ajuda. À Maella pelos momentos de descontração e risadas! Aos queridos papas de July que me acolheram em sua casa na Argentina.

À July, Heloísa, Alan, Salvador e também aos alunos do curso de ciências biológicas da UNESP-Botucatu (Caio, João, Carolina, Andrei, Gustavo, Larissa) pela ajuda em campo e na triagem e coleta dos insetos.

Obrigada a todos do Laboratório de Ecologia Evolutiva e Biologia Floral da Universidad de Córdoba por terem me recebido durante minha estadia em Córdoba.

A todos os amigos e familiares que, de alguma forma, me ajudaram durante o meu mestrado.

Muito Obrigada!

ÍNDICE

RESUMO	1
ABSTRACT	3
INTRODUÇÃO GERAL	5
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	11

CAPÍTULO I The role of ant-tended pericarpial nectaries on fruit protection against pre-dispersal seed predation in a widespread cerrado shrub

ABSTRACT	17
INTRODUCTION	18
MATERIAL AND METHODS	20
RESULTS	27
DISCUSSION	39
REFERENCES	44

CAPÍTULO II Efeito das interações multitróficas sobre a seleção mediada por polinizadores em *Tocoyena formosa* (Rubiaceae)

RESUMO	52
INTRODUÇÃO	53
MATERIAL E MÉTODOS	55
RESULTADOS	63
DISCUSSÃO	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
MATERIAL SUPLEMENTAR	87

CONSIDERAÇÕES FINAIS	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

VEIGA, P. A. S. **INTERAÇÕES MULTITRÓFICAS: O EFEITO DE FORMIGAS, BESOUROS E MARIPOSAS SOBRE A REPRODUÇÃO E MORFOLOGIA FLORAL DE *TOCOYENA FORMOSA* (RUBIACEAE)**. 2016. 93p. DISSERTAÇÃO (MESTRADO) – INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”, BOTUCATU.

RESUMO - Polinizadores são tidos como os principais agentes seletivos da morfologia floral. *Tocoyena formosa* (Rubiaceae) é uma espécie esfingófila, autoincompatível, completamente dependente de mariposas com probóscide longa para sua reprodução sexuada. A presença de variação interindividual na morfologia floral sugere que o comprimento do tubo da corola pode estar sujeito à seleção natural imposta por polinizadores. Entretanto, sua reprodução também é afetada pela atividade de predadores de sementes pré-dispersão. Por outro lado, os frutos em desenvolvimento possuem nectários pós-florais pericápicos (NPP) que atraem formigas, cuja interação mutualística deve mitigar a atividade dos predadores de sementes. Logo, o resultado da pressão seletiva imposta pelos polinizadores através do componente materno do *fitness* pode depender do efeito mútuo de antagonistas e formigas. Nesse contexto, para testar se formigas associadas aos NPPs de *T. formosa* conferem proteção aos frutos e sementes em desenvolvimento, e se predadores de sementes e formigas interferem no resultado da seleção imposta pelos polinizadores, nós realizamos experimentos de exclusão para avaliar o efeito de cada interagente sobre o êxito reprodutivo feminino (ERF) de *T. formosa*. Através de análise de caminhos e modelagem de equações estruturais determinamos a importância simultânea dos caracteres florais, mutualistas e antagonistas para o ERF da planta, e estimamos a ocorrência de seleção natural sobre o comprimento do tubo da corola. As formigas associadas aos NPPs não conferiram proteção aos frutos e sementes em desenvolvimento contra os principais predadores de sementes. Nem a abundância dos NPPs, tampouco a composição da fauna de formigas influenciaram no resultado da interação. Apesar dos predadores de sementes pré-dispersão terem tido um efeito negativo sobre o ERF através da diminuição do número de sementes por fruto, eles não influenciaram nem na direção, tampouco na magnitude da seleção fenotípica imposta pelos polinizadores sobre a morfologia floral. Provavelmente, a elevada frequência de visitas dos esfingídeos e a efetividade do serviço de polinização compensaram os efeitos negativos dos predadores de sementes sobre a reprodução de *T. formosa*. A natureza do sistema de polinização, no qual o pólen é transportado em massas que formam uma unidade discreta que se adere à probóscide dos polinizadores favorece a transferência de pólen entre flores cujo comprimento do tubo da corola é igual ou maior do que o da flor doadora. Dessa forma, plantas com tubos florais longos atuam principalmente como receptoras de pólen, podendo formar proporcionalmente mais frutos do que plantas com tubos curtos. Por sua vez, flores com tubo curto atuam

principalmente como doadoras de pólen, sendo favorecidas, provavelmente, via êxito reprodutivo masculino. Logo, o efeito líquido da seleção fenotípica mediada por polinizadores sobre o comprimento do tubo floral, também pode depender da direção e magnitude das pressões seletivas atuando mutuamente sobre os dois componentes do êxito reprodutivo. Além de trazer evidências de que os polinizadores atuam como os principais agentes seletivos da morfologia floral via ERF, o nosso estudo também destaca a importância da elevada efetividade do serviço de polinização para a reprodução de *Tocoyena formosa*.

Palavras-chave: Esfingofilia, Cerrado, Curculionidae, mutualismo defensivo, polinização, seleção fenotípica.

VEIGA, P. A. S. **MULTITROPHIC INTERACTIONS: THE EFFECT OF ANTS, BEETLES AND MOTHS ON THE REPRODUCTION AND FLORAL MORPHOLOGY OF *TOCOYENA FORMOSA* (RUBIACEAE)**. 2016. 93p. DISSERTAÇÃO (MESTRADO) – INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”, BOTUCATU.

ABSTRACT - Pollinators are considered the main selective agents of floral morphology. *Tocoyena formosa* (Rubiaceae) is a self-incompatible sphingophilous species, completely dependent on long-tongued hawkmoths for sexual reproduction. Interplant variations in floral morphology suggest that the corolla tube length may be subjected to natural selection imposed by pollinators. However, its reproduction is also affected by the activity of pre-dispersal seed predators. On the other hand, the developing fruits possess post-floral pericarpial nectaries (PPN) which are constantly visited by mutualistic ants that should mitigate the activity of such seed predators. Therefore, the result of pollinator-mediated selection through the female component of fitness may depend on the mutual effect of antagonists and ants. In this context, to test whether PPN-associated ants provide protection to the developing fruit and seeds, as well as, whether pre-dispersal seed predators and ants affect the result of selection imposed by pollinators, we performed exclusion experiments to assess the effect of each interactor on the female reproductive success of *T. formosa*. For this end, we used path analysis combined with structural equation modeling to determine the simultaneous importance of floral traits, mutualists and antagonists to the female reproductive success, and estimated the natural selection acting on flower tube length. The PPN-attracted ants did not provide protection to the developing fruits and seeds against the main seed predators. Neither the abundance of NPPs, nor the composition of the ant fauna affected the outcome of the interaction. Despite the negative effect of pre-dispersal seed predators on plant reproductive success by reducing the number of seeds per fruit, they did not influence on the direction or the magnitude of the phenotypic selection imposed by pollinators on flower morphology. Probably, the high frequency of hawkmoths visits and the effectiveness of the pollination service may have compensated the negative effects of seed predators on *T. formosa* reproduction. The nature of pollen transfer mechanism, by which pollen grains are clumped in discreet units adhered to the pollinator proboscis, may favor the pollen flow from short-tubed to long-tubed flowers in the population. Thus, long-tubed flowers are more effective in pollen receipt, and thus may produce proportionately more fruits than short-tubed ones. Short-tubed flowers, in turn, may act mainly as pollen donors being, probably, favored through the male component of the reproductive success. Therefore, the net effect of pollinator-mediated selection on flower tube length may also depend on the direction and

magnitude of the selective pressures acting simultaneously through both female and male components of fitness. Despite evidencing that pollinators act as the main selective agents via female reproductive success, this study also highlights the importance of the high pollination effectiveness to the reproduction of *Tocoyena formosa*.

Keywords: Cerrado, Curculionidae, defensive mutualism, phenotypic selection, pollination, Sphingophily.

INTRODUÇÃO GERAL

Estudos sobre as interações mutualísticas entre plantas e insetos são de fundamental importância para a compreensão dos processos relacionados à evolução e diversificação das plantas (Strauss & Irwin 2004; Bronstein *et al.* 2006). Associações entre plantas e polinizadores estão entre os tipos de interações mutualísticas mais bem documentadas. Neste sentido, diversos estudos têm apresentado fortes evidências de que caracteres florais evoluem como adaptações aos polinizadores (Galen 1996; Fenster *et al.* 2004; Harder & Johnson 2009). O que reforça a influência dos polinizadores na diversificação e radiação das angiospermas (Stebbins 1970; Dodd *et al.* 1999; Kay *et al.* 2006; Whittall & Hodges 2007).

Sistemas de polinização são, em sua maioria, generalistas e envolvem a associação com diversos grupos de polinizadores que podem exercer pressões de seleção distintas sobre os caracteres florais, que inclusive podem ser anuladas entre si (Waser *et al.* 1996; Johnson & Steiner 2000; Fenster *et al.* 2004; Sahli & Conner 2011; Sletvold *et al.* 2012). Nestes sistemas de polinização a importância de cada visitante floral como agente seletivo da morfologia floral não é tão evidente, uma vez que a contribuição de cada grupo de polinizadores para o êxito reprodutivo pode ser variável (Gómez *et al.* 2009). Por outro lado, em sistemas de polinização especializados as características florais geralmente refletem respostas adaptativas diretas à interação com um grupo específico de polinizadores (Galen 1996; Johnson & Steiner 2000). A seleção natural, por sua vez, opera quando a interação planta-polinizador confere maior êxito reprodutivo (*fitness*) a plantas com determinado fenótipo floral em detrimento dos demais fenótipos presentes na população. Logo, a seleção natural produz efeitos fenotípicos imediatos em cada geração, que podem ser medidos de forma independente dos princípios da hereditariedade e da evolução (Land & Arnold 1983). Porém, para que a seleção provoque mudanças na distribuição do fenótipo na população de uma geração a outra, é necessário que uma proporção significativa das diferenças fenotípicas seja herdável. Desta forma, mudanças evolutivas no fenótipo floral podem refletir respostas adaptativas à seleção imposta pelos polinizadores (Land & Arnold 1983; Strauss *et al.* 2005; Gómez *et al.* 2009). Desde a introdução de métodos que possibilitam inferências quantitativas da ação da seleção natural (Land & Arnold 1983; Arnold & Wade 1984; Schluter 1988; Morrissey & Sakrejda 2013), alguns estudos sobre evolução floral têm abordado o efeito das pressões seletivas impostas por polinizadores sobre caracteres florais relacionados, principalmente, à atração e ao ajuste morfológico entre a flor e o agente de polinização (veja Maad 2000; Benitez-Vieyra *et al.* 2006; Sletvold *et al.* 2010; Moré *et al.* 2012; Sletvold *et al.* 2012). Caracteres florais de atração podem influenciar a reprodução da planta através de seu efeito sobre o

comportamento dos polinizadores, por outro lado, caracteres de ajuste atuam sobre a efetividade da remoção e deposição do pólen. Estes estudos têm evidenciado que caracteres florais, tais como, número de flores, tamanho, forma, cor, recurso energético e fenologia estão sujeitos à seleção imposta pelos polinizadores (revisão em Harder & Johnson 2009). Longos tubos da corola e esporões atuam no ajuste morfológico entre a planta e o polinizador, logo, sua evolução parece estar diretamente relacionada às pressões seletivas impostas pelos polinizadores (Nilsson 1988; Johnson & Steiner 1997; Maad 2000; Alexandersson & Johnson 2002; Pauw *et al.* 2009; Moré *et al.* 2012).

Polinizadores possuem uma importância inquestionável para a reprodução da maioria das angiospermas (Ollerton *et al.* 2011). No entanto, as plantas são constantemente visitadas por uma enorme diversidade de organismos cujos efeitos podem influenciar diretamente ou indiretamente seu *fitness* (veja Gómez 2008). Além do que, cada interagente pode modificar, reforçar e, inclusive anular de forma recíproca, o impacto individual do outro organismo sobre a planta (*e.g.* Mothershead & Marquis 2000; Gómez 2005; Strauss *et al.* 2005). Por exemplo, através do efeito sobre a taxa de frutificação, polinizadores podem influenciar a taxa de predação dos frutos, uma vez que antagonistas podem danificar preferencialmente frutos de plantas com maior abundância e/ou maior tamanho de frutos (*e.g.* Herrera 2000; Cariveau *et al.* 2004). Os predadores, por sua vez, podem anular os benefícios relacionados à maior taxa de polinização (Herrera 2000; Herrera *et al.* 2002). Assim, apesar da importância dos polinizadores como agentes seletivos da morfologia floral, outros fatores ecológicos podem afetar a intensidade da seleção natural agindo sobre os caracteres florais e influenciar a evolução floral (revisão em Strauss & Whittall 2006). Antagonistas também podem exercer pressões seletivas diretamente sobre os caracteres florais (*e.g.* Galen & Cuba 2001; Cariveau *et al.* 2004). Neste sentido, os caracteres florais podem sofrer pressões seletivas opostas caso polinizadores e antagonistas atuem sobre os mesmos caracteres (Gómez 2003; Toräng *et al.* 2008; Pérez-Barrales *et al.* 2013; Sletvold *et al.* 2015). Em determinados casos, a importância de antagonistas para processos de seleção fenotípica, pode ser inclusive maior que a dos polinizadores (Cariveau *et al.* 2004; Parachnowitsch & Caruso 2008). Por outro lado, o efeito dos antagonistas sobre a seleção natural em caracteres florais será indireto se sua atividade influenciar o efeito dos polinizadores (*e.g.* Mothershead & Marquis 2000). Predadores de sementes ainda em desenvolvimento nos frutos (daqui em diante ‘predadores de sementes pré-dispersão’) possuem um efeito direto sobre o componente feminino do *fitness*, e podem reduzir a oportunidade da seleção por polinizadores, caso sua atividade leve a diminuição de variações no *fitness* geradas através da interação com polinizadores (Herrera 2000; revisão em Strauss & Irwin 2004). Dessa forma, a importância de um organismo como agente seletivo

dependerá da presença e do efeito de outros organismos (Strauss *et al.* 2005). Assim, mudanças evolutivas no fenótipo floral serão determinadas pelo efeito conjunto dos múltiplos organismos sobre o *fitness* da planta (Galen & Cuba 2001; Herrera *et al.* 2002; Ehrlén *et al.* 2002; Gómez 2008).

Tocoyena formosa (Cham & Schltl.) K. Schum. (Rubiaceae) está entre as espécies lenhosas com distribuição mais ampla no bioma cerrado (Ratter *et al.* 2003). A espécie possui uma morfologia floral muito especializada que compreende uma flor com corola tubular, cujo tubo pode alcançar até 15 cm de comprimento (veja Silberbauer-Gottsberger 1972; Silberbauer-Gottsberger & Gottsberger 1975; Oliveira *et al.* 2004). Além da morfologia floral especializada a espécie é autoincompatível, o que torna sua reprodução completamente dependente de algumas espécies de mariposas da família Sphingidae, em especial aquelas com probóscide muito longas (> 6,0 cm). A ocorrência de variação interindividual no comprimento do tubo da corola em populações de *T. formosa* (numa amplitude entre 6,0 e 15,0 cm) possibilita, entretanto, que a espécie esteja sujeita a pressões seletivas exercidas pelos polinizadores. Contudo, o êxito reprodutivo feminino de *T. formosa*, *i.e.* formação de frutos e sementes, também está sujeito ao efeito de antagonistas, uma vez que durante o desenvolvimento dos frutos, as sementes são intensamente predadas por larvas de diversas ordens de insetos. Assim, caso determinados caracteres florais favoreçam a produção de mais frutos e sementes, indiretamente, também podem favorecer a atração de predadores de sementes pré-dispersão, cujo efeito pode influenciar no resultado da interação com polinizadores sobre o êxito reprodutivo feminino (Herrera 2000; Pérez-Barrales *et al.* 2013). Porém, após a senescência da flor que é caracterizada pela queda da corola, o ovário permanece aderido à planta e o nectário floral segue em funcionamento. Em flores polinizadas esse nectário permanece no fruto em desenvolvimento e passa a constituir o nectário pós-floral pericárpico (NPP), que é constantemente visitado por formigas (Santos & Del-Claro 2001, mas veja também Del-Claro *et al.* 2013; Falcão *et al.* 2014). Nesse sentido, a associação entre formigas e os NPPs pode representar um mutualismo defensivo e estar relacionada à diminuição da predação de sementes, o que poderia influenciar o resultado líquido do efeito dos predadores e polinizadores sobre o *fitness* feminino.

Mutualismos com formigas através de nectários extraflorais representam um mecanismo de defesa, no qual, em troca de proteção, plantas fornecem recurso energético às formigas (Bentley 1977; Koptur 2005). No cerrado, o mutualismo defensivo entre formigas e nectários extraflorais é um mecanismo amplamente distribuído entre as espécies vegetais (Oliveira & Leitão-Filho 1987) e possui um importante papel na defesa das plantas contra herbívoros foliares (Del-Claro *et al.* 1996; Oliveira 1997; Oliveira & Freitas 2004;

Nascimento & Del-Claro 2010; Alves-Silva & Del-Claro 2013). Em muitas espécies da família Rubiaceae após a abscisão da corola, o nectário floral permanece ativo sobre o ovário durante o desenvolvimento dos frutos (*e.g.* Amorim & Oliveira 2006; Del-Claro *et al.* 2013; Falcão *et al.* 2014). Porém, pouco se sabe acerca dos efeitos da presença dos NPPs sobre a predação de sementes (Santos & Del-Claro 2001; Del-Claro *et al.* 2013). Neste contexto, o resultado líquido das pressões seletivas impostas por polinizadores sobre determinados caracteres florais, também pode depender do resultado da interação com formigas e predadores de sementes pré-dispersão.

Mesmo que vários estudos tenham abordado o impacto de diversos interagentes sobre o *fitness* da planta (Brody & Mitchell 1997; Herrera 2000; Mothershead & Marquis 2000; Ehrlén *et al.* 2002; Herrera *et al.* 2002), poucos têm avaliado de forma conjunta o resultado líquido dessas interações sobre a seleção natural em caracteres florais. A influência da interação planta-polinizador sobre o *fitness* geralmente é avaliada separadamente da influência de outros interagentes, o que pode levar a resultados espúrios, já que o efeito líquido sobre o *fitness* e conseqüentemente sobre a seleção natural depende das interações multitróficas (Gómez 2003; Strauss & Irwin 2004; Strauss *et al.* 2005; Gómez 2008; Toräng *et al.* 2008).

No Brasil pouco tem sido estudado sobre seleção mediada por polinizadores, e segundo um levantamento recente (Benitez-Vieyra *et al.* 2014), dentre os estudos sobre seleção fenotípica mediada por polinizadores realizados nos últimos 20 anos, apenas um trabalho foi realizado no Brasil (Moré *et al.* 2012). Por outro lado, estudos envolvendo o efeito de antagonistas e outros mutualistas sobre a seleção imposta por polinizadores ainda são inexistentes. Logo, *Tocoyena formosa*, cuja frutificação é afetada pela atividade concomitante de polinizadores, predadores de sementes e formigas, representa um bom modelo para o estudo do efeito das interações multitróficas sobre a morfologia floral.

Embora a seleção natural possa ser interpretada como a relação entre os valores de fenótipo e seu respectivo êxito reprodutivo, a seleção também pode atuar de forma indireta através de caracteres correlacionados (*e.g.* Gómez 2000). Neste sentido, a existência de associação entre caracteres fenotípicos pode invalidar os resultados da análise de seleção sobre determinado caractere fenotípico. A fim de solucionar tais ressalvas, diversas técnicas baseadas em análises multivariadas foram propostas para quantificar a ação da seleção sobre um caractere de forma independente do seu efeito indireto operando através de outro caractere correlacionado (Land & Arnold 1983; Mitchell-Olds & Shaw 1987). Adicionalmente, tais metodologias podem ser utilizadas em associação com técnicas alternativas que representam soluções às limitações estatísticas inerentes à regressão múltipla, como por exemplo, técnicas

não paramétricas (veja Schluter 1988; Brodie *et al.* 1995; Morrisay & Sakrejda 2013; Benitez-Vieyra *et al.* 2014). Análises de rotas (*path analysis*) e modelagens de equações estruturais (SEM), por sua vez, permitem testar relações causais multivariadas complexas entre os interagentes, os caracteres florais e o *fitness* da planta, revelando as relações diretas e indiretas entre as variáveis (Kingsolver & Schemsk 1991). Além do que, também possibilitam testar hipóteses sobre a importância dos distintos interagentes para seleção fenotípica atuando em determinado caractere. Desta forma, tais metodologias constituem uma importante ferramenta para estudos de seleção em caracteres quantitativos (*e.g.* Gómez 2000; Cariveau *et al.* 2004). Finalmente, em conjunto com estudos de genética, essas técnicas permitem testar hipóteses adaptativas e inferir mudanças evolutivas nas características florais (Gómez 2000).

A ação de outros interagentes que também pode influenciar na direção e força da seleção fenotípica, o que pode dificultar a interpretação dos resultados das análises de seleção, uma vez que os gradientes de seleção não trazem informação sobre a identidade dos agentes da seleção fenotípica observada. Assim para quantificar a importância de cada interagente para seleção é necessário abrir mão de metodologias que envolvam manipulação experimental (Parachnowitsch & Caruso 2008; Sandring & Ågren 2009; Sletvold *et al.* 2010; Sletvold *et al.* 2015). Porém, poucos trabalhos têm quantificado experimentalmente a importância simultânea de polinizadores e antagonistas para a seleção sobre a morfologia floral (Gómez 2003; Ågren *et al.* 2013; Sletvold *et al.* 2015). A seleção imposta por polinizadores pode ser identificada através da comparação da seleção estimada em plantas expostas à polinização natural e plantas após a suplementação manual de pólen (Galen 1996; Fishman & Willis 2008; Sandring & Ågren 2009; Sletvold *et al.* 2010). De forma similar, o estudo de mutualistas e antagonistas como agentes de seleção requer abordagens experimentais que permitam quantificar o efeito isolado, assim como a interação dos múltiplos interagentes (*e.g.* Sletvold *et al.* 2015).

Neste contexto, o presente estudo teve como principais objetivos testar o efeito simultâneo da interação com polinizadores, predadores de sementes pré-dispersão e formigas mutualistas sobre a reprodução de *Tocoyena formosa*, assim como, quantificar a importância dos mutualistas e antagonistas para a seleção fenotípica sobre os caracteres florais.

Este trabalho está dividido em dois capítulos, nos quais nós utilizamos diferentes abordagens metodológicas e experimentais para investigar o efeito de mutualistas e antagonistas sobre a reprodução de *T. formosa*. No **Capítulo I** testamos experimentalmente o efeito da interação com formigas e predadores de sementes sobre o êxito reprodutivo feminino (*i.e.* produção de frutos e sementes). Especificamente, nós identificamos a fauna de formigas e dos predadores de sementes pré-dispersão associados aos frutos em desenvolvimento.

Determinamos experimentalmente se a interação com formigas mediada pelos nectários pós-florais pericárpicos (NPPs) confere proteção aos frutos e sementes contra predadores pré-dispersão. Adicionalmente, nós também testamos se a espécie de formiga e a disponibilidade de recursos, *i.e.* néctar, influenciam o efeito das formigas sobre a frutificação. Já no **Capítulo II**, nós utilizamos uma abordagem experimental em conjunto com análise de caminhos e modelagens de equações estruturais para determinar o efeito simultâneo das interações multitróficas e da morfologia floral no êxito reprodutivo feminino de *T. formosa*. Subsequentemente, nós estimamos os gradientes de seleção fenotípica agindo sobre o comprimento do tubo floral e identificamos os principais agentes de seleção natural.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ÅGREN, J.; HELLSTRÖM, F.; TORÄNG, P.; EHRLÉN, J. 2013. Mutualists and antagonists drive among-population variation in selection and evolution of floral display in a perennial herb. *PNAS* 110: 18202-18207.
- ALEXANDERSSON, R.; JOHNSON, S.D. 2002. Pollinator-mediated selection on flower-tube length in a hawkmoth-pollinated *Gladiolus* (Iridaceae). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Science* 269: 631-636.
- ALVES-SILVA, E.; DEL-CLARO, K. 2013. Effect of post-fire resprouting on leaf fluctuating asymmetry, extrafloral nectar quality, and ant-plant-herbivore interactions. *Naturwissenschaften* 100: 525-532.
- AMORIM, F.W.; OLIVEIRA, P.E. 2006. Estrutura sexual e ecologia reprodutiva de *Amaioua guianensis* Aubl. (Rubiaceae), uma espécie dioica de formações florestais de cerrado. *Revista Brasileira de Botânica* 29: 353-362.
- ARNOLD, S.J.; WADE, M.J. 1984. On the measurement of natural and sexual selection: applications. *Evolution* 38: 720-734.
- BENITEZ-VIEYRA, S.; MEDINA, A.M.; GLINOS, E.; COCUCCHI, A.A. 2006. Pollinator-mediated selection on flower traits and size of floral display in *Cyclopogon elatus*, a sweat bee-pollinated. *Functional Ecology* 20: 948-957.
- BENITEZ-VIEYRA, S.; MOREÍ, M.; AMORIM, F.W. 2014. Seleção Fenotípica mediada por polinizadores. *In: Rech A.R.; Agostini K.; Oliveira P.E.; Machado I.C. (eds.). Biologia da polinização. Rio de Janeiro, BR: Projeto Cultural, 349-371.*
- BENTLEY, B.L. 1977. Extrafloral nectaries and protection by pugnacious bodyguards. *Annual Review of Ecology and Systematics* 8: 407-428.
- BRODIE, E.D.; MOORE, A.J.; JANZEN, F.J. 1995. Visualizing and quantifying natural selection. *Trends in Ecol. Evol.* 10: 313-318.
- BRODY, A.K.; MITCHELL, R.J. 1997. Effects of experimental manipulation of inflorescence size on pollination and pre-dispersal seed predation in the hummingbird-pollinated plant *Ipomopsis aggregata*. *Oecologia* 110:86-93.
- BRONSTEIN, J.L.; ALARCÓN, R.; GEBER, M. 2006. The evolution of plant-insect mutualism. *New Phytologist* 172: 412-428.
- CARIVEAU, D.; IRWIN, R.E.; BRODY, A.K.; GARCIA-MAYEYA, L.S.; VON DER OHE, A. 2004. Direct and indirect effects of pollinators and seed predators to selection on plant and floral traits. *Oikos* 104: 15-26.

- DEL-CLARO, K.; BERTO, V.; RÉU, W. 1996. Effect of herbivore deterrence by ants increase fruit set in an extrafloral nectary plant, *Qualea multiflora* (Vochysiaceae). *Journal of Tropical Ecology* 12: 887-892.
- DEL-CLARO, K.; GUILLERMO-FERREIRA, R.; ALMEIDA, E.M.; ZARDINI, H.; TOREZAN-SILINGARDI, H.M. 2013. Ants visiting the post-floral secretions of pericarpial nectaries in *Palicourea rigida* (Rubiaceae) provide protection against leaf herbivores but not against seed parasites. *Sociobiology* 60: 217-221.
- DODD, M.E.; SILVERTOWN, J.; CHASE, M.W. 1999. Phylogenetic analysis of trait evolution and species diversity variation among angiosperm families. *Evolution* 53: 732-744.
- EHRLÉN, J.; KÄCK, S.; ÅGREN, J. 2002. Pollen limitation, seed predation and scape length in *Primula farinosa*. *Oikos* 97: 45-51.
- FALCÃO, J.C.F.; DÁTILLO, W.; IZZO, T.J. 2014. Temporal variation in extrafloral nectar secretion in different ontogenic stages of the fruits of *Alibertia verrucosa* S. Moore (Rubiaceae) in a Neotropical savanna. *Journal of Plant Interactions* 9: 137-142.
- FENSTER, C.B.; ARMBRUSTER, W.S.; WILSON, P.; DUDASH, M.R.; THOMSON J.D. 2004. Pollination syndromes and floral specialization. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 35: 375-403.
- FISHMAN, L.; WILLIS, J.H. 2008. Pollen limitation and natural selection on floral characters in the yellow monkeyflower, *Mimulus guttatus*. *New Phytologist* 177: 802-810.
- GALEN, C. 1996. Rates of floral evolution: adaptation to bumblebee pollination in an alpine wildflower, *Polemonium viscosum*. *Evolution* 50: 120-125.
- GALEN, C.; CUBA, J. 2001. Down the tube: pollinators, predators, and the evolution of flower shape in the alpine skypilot, *Polemonium viscosum*. *Evolution* 55: 1963-1971.
- GÓMEZ, J.M. 2000. Phenotypic selection and response to selection in *Lobularia maritima*: importance of direct and correlational components of natural selection. *Journal of Evolutionary Biology* 13: 689-699.
- GÓMEZ, J.M. 2003. Herbivory reduces the strength of pollinator-mediated selection in the Mediterranean herb *Erysimum mediohispanicum*: consequences for plant specialization. *The American Naturalist* 162: 242-256
- GÓMEZ, J.M. 2005. Non-additive effects of herbivores and pollinators on *Erysimum mediohispanicum* (Cruciferae) fitness. *Oecologia* 143: 412-418.
- GÓMEZ, J.M. 2008. Sequential conflicting selection due to multispecific interactions triggers evolutionary trade-offs in a monocarpic herb. *Evolution* 62: 668-679.

- GÓMEZ, J.M.; PERFECTTI, F.; BOSCH, J.; CAMACHO, J.P.M. 2009. A geographic selection mosaic in a generalized plant-pollinator-herbivore system. *Ecological Monographs* 79: 245-263.
- HARDER, L.D.; JOHNSON, S.D. 2009. Darwin's beautiful contrivances: evolutionary and functional evidence for floral adaptation. *New Phytologist* 183: 530-545.
- JOHNSON, S.D.; STEINER, K.E. 1997. Long-tongued fly pollination and evolution of floral spur length in the *Disa draconis* complex (Orchidaceae). *Evolution* 51: 45-53.
- HERRERA, C.M. 2000. Measuring the effects of pollinators and herbivores: evidence for non-additivity in a perennial herb. *Ecology* 81: 2170-2176.
- HERRERA, C.M.; MEDRANO, M.; REY, P.J.; SÁNCHEZ-LAFUENTE, A.M.; GARCÍA, M.B.; GUITIÁN, J.; MANZANEDA, A.J. 2002. Interaction of pollinators and herbivores on plant fitness suggests a pathway for correlated evolution of mutualism- and antagonism-related traits. *PNAS* 99: 16823-16828.
- JOHNSON, S.D.; STEINER, K.E. 2000. Generalization versus specialization in plant pollination systems. *TREE* 15: 140-143.
- KAY, K.M.; VOELCKEL, C.; YANG, J.Y.; HUFFORD, K.M.; KASKA, D.D.; HODGES, S.A. 2006. Floral characters and species diversification. *In: Harder L.D.; Barret S.C.H. (eds.). Ecology and Evolution of flowers.* Oxford, UK: Oxford University Press, 311-325.
- KINGSOLVER, J.G.; SCHEMSKE, D.W. 1991. Path analysis of selection. *Trends Ecol. Evol.* 6: 276-280.
- KOPTUR, S. 2005. Nectar as fuel for plant protectors. *In: Wackers F.L.; Van-Rijn P.C.J.; Bruin J. (eds.). Plant provided food for carnivorous insects: a protective mutualism and its applications.* Cambridge, UK: Cambridge University Press, 75-108.
- LAND, R.; ARNOLD, S.J. 1983. The measurement of selection on correlated characters. *Evolution* 37: 1210-1226.
- MAAD, J. 2000. Phenotypic selection in hawkmoth-pollinated *Platanthera bifolia*: targets and fitness surfaces. *Evolution* 54: 112-123.
- MITCHELL-OLDS, T.; SHAW, R.G. 1987. Regression analysis of natural selection: statistical inference and biological interpretation. *Evolution* 41: 1149-1161.
- MORÉ, M.; AMORIM, F.W.; BENITEZ-VIEYRA, S.; MEDINA, A.M.; SAZIMA, M.; COCUCCI, A.A. 2012. Armament imbalances: match and mismatch in plant-pollinator traits of highly specialized long-spurred Orchids. *PloS One* 7: 1-9.
- MORRISSEY, M.B.; SAKREJDA, K. 2013. Unification of regression-based methods for the analysis of natural selection. *Evolution* 67: 2094-2100.

- MOTHERSHEAD, K.; MARQUIS, R.J. 2000. Fitness impacts of herbivory through indirect effects on plant-pollinator interactions in *Oenothera macrocarpa*. *Ecology* 81: 30-40.
- NASCIMENTO, E. A.; Del-Claro, K. 2010. Ant visitation to extrafloral nectaries decreases herbivory and increases fruit set in *Chamaecrista debilis* (Fabaceae) in a Neotropical savanna. *Flora* 205: 754-756.
- NILSSON, L. A. 1988. Evolution of flowers with deep corolla tubes. *Nature* 334: 147-149.
- OLIVEIRA, P.S. 1997. The ecological function of extrafloral nectaries: herbivore deterrence by visiting ants and reproductive output in *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae). *Functional Ecology* 11: 323-330.
- OLIVEIRA, P.S.; LEITÃO-FILHO, H.F. 1987. Extrafloral nectaries: their taxonomic distribution and abundance in the woody flora of Cerrado vegetation in southeast Brazil. *Biotropica* 19: 140-148.
- OLIVEIRA, P.S.; FREITAS, A.V.L. 2004. Ant-plant-herbivore interactions in the neotropical cerrado savanna. *Naturwissenschaften* 91: 557-570.
- OLIVEIRA, P.E.; GIBBS, P.E.; Barbosa, A.A. 2004. Moth pollination of woody species in the Cerrados of Central Brazil: a case of so much owed to so few? *Plant Systematics and Evolution* 245: 41-54.
- OLLERTON, J.; WINFREE, R.; TARRANT, S. 2011. How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos* 120: 321-326.
- PARACHNOWITSCH, A.L.; CARUSO, C.M. 2008. Predispersal seed herbivores, not pollinators, exert selection on floral traits via female fitness. *Ecology* 89: 1802-1810.
- PAUW, A.; STOFBERG, J.; WATERMAN, R.J. 2009. Flies and flowers in Darwin's race. *Evolution* 63: 268-279.
- PÉREZ-BARRALES, R.; BOLSTAD, G.H.; PÉLABON, C.; HANSEN, T.F.; ARMBRUSTER, W.S. 2013. Pollinators and seed predators generate conflicting selection on *Dalechampia* blossoms. *Oikos* 122: 1411-1428.
- RATTER, J.A.; BRIDGEWATER, S.; RIBEIRO, J.F. 2003. Analysis of the floristic composition of the Brazilian Cerrado vegetation III: comparison of the woody vegetation of 376 areas. *Edinburgh Journal of Botany* 60:57-109.
- SAHLI, H.F.; CONNER, J.K. 2011. Testing for conflicting and nonadditive selection: floral adaptation to multiple pollinators through male and female fitness. *Evolution* 65: 1457-1473.
- SANDRING, S.; AGREN, J. 2009. Pollinator-mediated selection on flower display and flowering time in the perennial herb *Arabidopsis lyrata*. *Evolution* 63: 1292-1300.

- SANTOS, J.C.; DEL-CLARO, K. 2001. Interação entre formigas, herbívoros e nectários extraflorais em *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlechtd.) K. Schum. (Rubiaceae) na vegetação do cerrado. *Revista Brasileira de Zoociências* 3: 77-92.
- SCHLUTER, D. 1988. Estimating the form of natural selection on a quantitative trait. *Evolution* 42: 849-861.
- SILBERBAUER-GOTTSBERGER, I. 1972. Anthese und Bestubung der Rubiaceen *Tocoyena brasiliensis* und *T. formosa* aus dem Cerrado Brasiliens. *Sterreichische Botanische Zeitschrift* 120: 1-13.
- SILBERBAUER-GOTTSBERGER, I.; GOTTSBERGER, G. 1975. Über sphingophile Angiospermen brasiliens. *Plant Systematic and Evolution* 123: 157-184.
- SLETVOLD, N.; GRINDELAND, J.M.; ÅGREN, J. 2010. Pollinator-mediated selection on floral display, spur length and flowering phenology in the deceptive orchid *Dactylorhiza lapponica*. *New Phytologist* 188: 385-392.
- SLETVOLD, N.; TRUNSCHKE, J.; WIMMERGREN, C.; ÅGREN, J. 2012. Separating selection by diurnal and nocturnal pollinators on floral display and spur length in *Gymnadenia conopsea*. *Ecology* 93: 1880-1891.
- SLETVOLD, N.; MORITZ, K.K.; ÅGREN, J. 2015. Additive effect of pollinators and herbivores result in both conflicting and reinforcing selection on floral traits. *Ecology* 96: 214-221.
- STEBBINS, G.L. 1970. Adaptive radiation of reproductive characteristics in angiosperms. I. Pollination mechanisms. *Annual Review of Ecology and Systematics* 1: 307-326.
- STRAUSS, S.Y.; IRWIN, R.E. 2004. Ecological and evolutionary consequences of multispecies plant-animal interactions. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 35: 435-466.
- STRAUSS, S.Y.; SAHLI, H.; CONNER, J.K. 2005. Toward a more trait-centered approach do diffuse (co)evolution. *New phytologist* 165: 81-90.
- STRAUSS, S.Y.; WHITTALL, J.B. 2006. Non-pollinator agents of selection on floral traits. *In: Harder L.D.; Barret S.C.H. (eds.). Oxford, UK: Oxford University Press, 120-139.*
- TORÄNG, P.; EHRLÉN, J.; ÅGREN, J. 2008. Mutualists and antagonists mediate frequency-dependent selection on floral display. *Ecology* 89: 1564-1572.
- WASER, N.M.; CHITTKA, L.; PRICE, M.V.; WILLIAMS, N.M.; OLLERTON, J. 1996. Generalization in pollination systems, and why it matters. *Ecology* 77: 1043-1060.
- WHITTALL, J.B.; HODGES, S.A. 2007. Pollinator shifts drive increasingly long nectar spurs in Columbine flowers. *Nature* 447: 706-710.

CAPÍTULO I

The role of ant-tended pericarpial nectaries on fruit protection against pre-dispersal seed predation in a widespread cerrado shrub ¹

Priscila Andre Sanz Veiga^{1*}, Leonardo Ré Jorge², Santiago Benitez-Vieyra³, Felipe Wanderley Amorim¹

¹ Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, São Paulo, Brazil

² Departamento de Biologia Animal, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

³ Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (CONICET), Universidad Nacional de Córdoba, Ciudad de Córdoba, Córdoba, Argentina

* Corresponding author

E-mail: psanzveiga@gmail.com (PASV)

¹ Capítulo apresentado conforme as normas da Plos ONE

Abstract

Extrafloral nectaries (EFNs) related to ant-plant defensive mutualisms can occur in both vegetative and reproductive plant structures. The presence of post-floral pericarpial nectaries (PPNs) might be strategic for fruit protection against seed predators, as plants are expected to invest higher on more valuable and vulnerable parts. In many Rubiaceae species in the Brazilian Cerrado, after corolla abscission, the floral nectary continues to secrete nectar throughout fruit development forming PPNs which commonly attract many ant species. Here, we experimentally investigated whether the interaction with ants mediated by the PPNs of *Tocoyena formosa* influenced plant reproductive success by reducing the number of seed predators on fruits. We also assessed whether ant protection was dependent on ant species composition and resource availability. Although most of the plants were visited by large and aggressive ant species, such as *Ectatomma tuberculatum* and *Camponotus* spp., ants did not protect fruits against seed predators. Furthermore, the result of the interaction was neither related to ant species composition nor to the availability of resources. We suggest that these results may be, at least in part, related to the nature and behavior of the most important seed predators, like the *Hemicolpus abdominalis* weevil. On the other hand, at the community level, not explored factors, such as reward quality local ant abundance, ant colony characteristics and/or the presence of alternative energetic sources could also account for variations in ant frequency, composition, and ant protective effects, revealing the great conditionality of facultative ant-plant mutualisms. Finally, because variations in fruit production due to pollinator's temporal fluctuation are common in highly specialized pollination systems, we suggest that ant defense could be more necessary or important during periods of low fruit set or higher seed predation.

Keywords: Ant-plant interactions; *Ectatomma tuberculatum*; *Hemicolpus abdominalis*; mutualism; *Tocoyena formosa*; weevil

Introduction

Ant-plant defensive mutualisms represent an indirect defense strategy widely distributed among angiosperms in which plants provide energetic resources and/or housing for ants that in turn provide protection against herbivores [1-4]. Ant-plant associations range from facultative to obligate (reviewed in [5]) and plants involved in obligate and more specific associations generally invest more energy on food rewards and nesting structures to the mutualists, which may guarantee higher fidelity and effectiveness of ants [3, 6, 7]. On the other hand, facultative mutualisms involve looser associations, in which ants are attracted to food resource produced by the plant but do not nest on the plant, in such associations plants can interact with many different and unspecific ant species [8, 9].

Most ant-plant associations are facultative [3, 5] and associations with defensive ants mediated by extrafloral nectaries (EFNs) represent a classic example of such non-obligatory interaction [1, 10, 11]. Extrafloral nectar is produced in secretory glands, generally not involved in pollination [1, 12]. EFN-visiting ants can protect plants by deterring or preying upon leaf [10, 13, 14], bud and flower herbivores [11, 15-17], as well as pre-dispersal seed predators [18, 19]. However, some studies have suggested that EFN-visiting ants may be very ineffective in plant defense [20-25] or even have negative effects by repelling pollinators or the natural enemies of herbivores [26, 27]. Hence, the outcome of ant-plant interactions may vary along a continuum from positive to negative effects [28], and the net result of the interaction depends on ant density and herbivore abundance [29], ant behavior [16, 22, 25, 30, 31], herbivore vulnerability to ant predation [21, 24, 29, 32-34], plant traits and resource abundance [34-38], presence of other arthropods competing with ants for extrafloral nectar [12, 39], and abiotic conditions [40-42].

Although EFNs are present in both vegetative and reproductive structures, according to the predictions of optimal defense theory, plants are expected to invest more in protection of the most vulnerable and valuable parts, such as young leaves, buds and flowers [43, 44].

The occurrence of EFNs on reproductive structures may represent one example of such investment, as these parts are directly related to plant reproductive success [45]. Some studies have assessed the role of EFNs located on reproductive parts, mainly on pedicels, sepals and bracts [18, 20]. Some EFNs located on the pedicel and bracts can extend their activity throughout the whole plant reproductive stage and attract ants to protect buds, flowers and developing seeds [43, 45, 46]. Moreover, plants can also present EFNs on fruits derived from newly developed structures [43, 47, 48] or from persistent floral nectaries [49-51]. In the last case, the so-called post-floral pericarpial nectaries (PPNs) may be related to fruit protection against pre-dispersal seed predators [19]. However, the few studies that have so far investigated the effectiveness of the association between ants and PPNs on fruit protection have provided some contrasting results [19, 50, 52].

In the Brazilian Cerrado, EFN-bearing plants are very common and widespread in many families [53, 54], and their association with ants is effective on the protection of vegetative and reproductive plant structures parts [11, 14, 16, 17, 55]. In many species among the Rubiaceae family, the floral nectaries continue to secrete nectar following the flower senescence and corolla abscission originating PPNs [e.g., 49, 50, 51]. However, only few studies have investigated the importance of PPNs on plant reproductive success [50, 52]. *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlechtd.) K. Schum. (Rubiaceae) is a common and widely distributed shrub in the Cerrado (see [56]), that produces fruit-bearing PPNs which are constantly visited by ants. In contrast to the small foliar NEFs commonly found in other Cerrado plants, PPNs of *T. formosa* produce copious amounts of nectar throughout fruit development. Moreover, even ovaries from non-pollinated flowers continue to produce nectar for about two months after corolla abscission (P.A.S Veiga, personal observation, Fig 1). Hence, contrary to the notion that facultative ant-plant associations involve lower plant investment in energetic resource to the mutualists [6, 7, 57], these observations suggest that non-obligatory associations may also have high costs. In this context, we hypothesized that

such a high investment in energetic reward in *T. formosa* may provide fruit protection against pre-dispersal seed predators. However, since reward availability may influence in the outcome of ant-plant interaction [58, 59] and the number of nectaries are highly variable among *T. formosa* plants, both ant visitation frequency and species composition may also be affected by nectar availability. In this sense, we also hypothesize that plants with more nectaries will receive more visits from competitively superior ant species with higher defensive abilities [30, 60], which may result in higher reproductive success in terms of fruit and seed set.

In this context, the main goals of this study was to test whether PPN-visiting ants have a positive effect on *T. formosa* reproductive success by reducing seed predator infestation, and whether protection is affected by ant species composition and resource availability. To this purpose, we used experimental and observational approach and addressed the following questions: (1) What are the most important pre-dispersal seed predators of *T. formosa*? (2) Are there differences in ant fauna composition among plants? (3) Do ants have a positive effect on plant reproduction by decreasing pre-dispersal seed predation? (4) Ant protection depends on the dominant ant species? (5) Does resource availability (number of nectaries) influence ant visitation and ant effect on plant reproduction? (6) Does nectary abundance influence at the same time ant fauna composition and the plant reproductive success?

Material and methods

Study site and species characterization

The study was carried out during the years 2014-2015 in a Cerrado area in a private reserve at “Palmeira da Serra Farm” (22°48’50” S, 48°44’40” W). The reserve is located in the municipality of Pratânia, São Paulo state, southeastern Brazil, and is constituted by two main plant physiognomies: cerrado *stricto sensu*, a vegetation dominated by herbs, shrubs and small trees and, “cerradão”, a dense woodland made up of trees about 10 m (for further details see [61]). The total area covers approximately 224 ha. with an elevation of 720 m a.s.l., and

the climate is warm temperate (Cwa according to Köppen 1984) and characterized by two well-established seasons, i.e., a dry winter from March to September and a hot summer from October to April. The mean annual temperature is 21°C and annual precipitation is around 1450 mm [62].

At the study area *T. formosa* is a caducifolious shrub (< 3 m) which leaf loss occurs during the driest months (June to August), and new leaves are produced throughout spring (September-October). Flowers are produced in inflorescences at the apex of branches and flowering occurs in November-January, and fruiting in March-April. Flowers are tubular and the corolla tube length ranges between 70 and 140 mm. Pollination and sexual reproduction of *T. formosa* relies exclusively on long-tongued hawkmoths [63, 64]. In this species, after corolla abscission the floral nectary remains active and becomes an extrafloral nectary with post-floral secretion (Fig 1) [52].

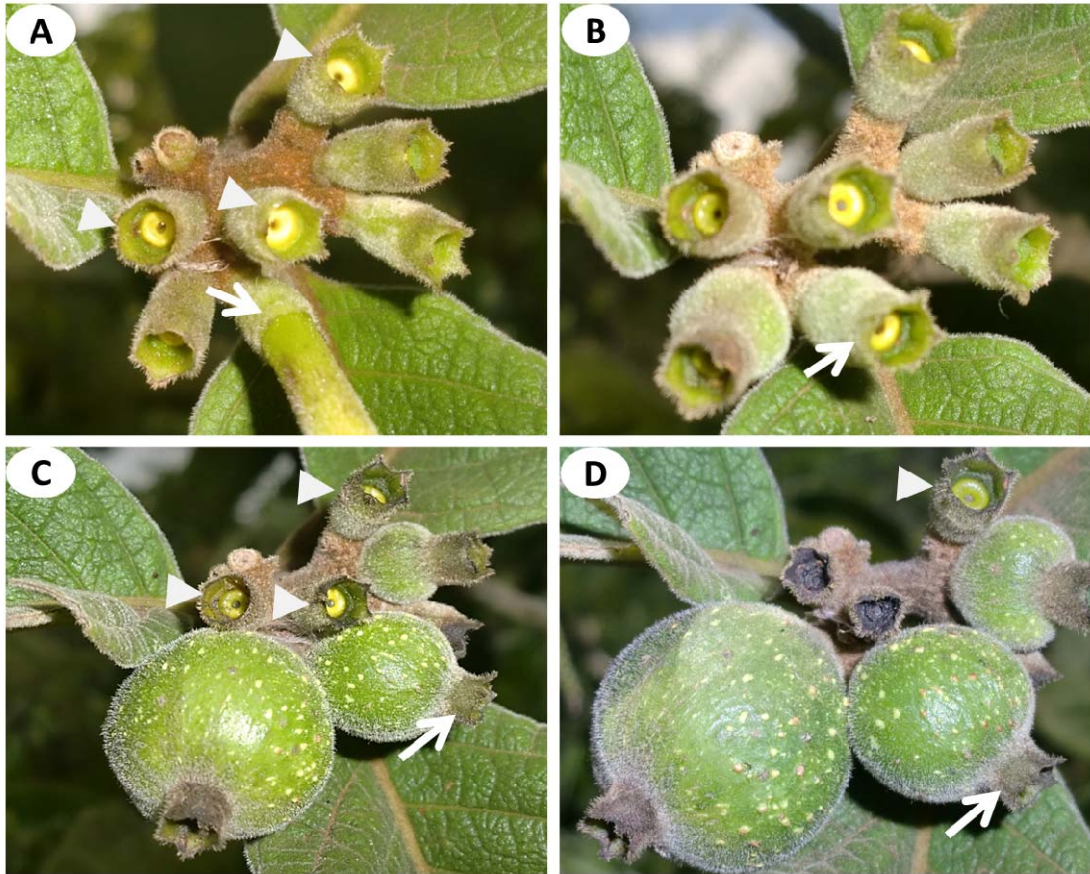


Fig 1. Post-floral pericarpial nectaries of *T. formosa* at different developmental stages.

(A) Active post-floral nectaries just after corolla abscission (arrow heads). Note the corolla tube of flower before abscission (arrow). (B) Post-floral pericarpial nectary (PPN) at the initial stage of development after one month of flower pollination (arrow). (C) PPN after two months of flower pollination (arrow), and post-floral nectaries derived of non-pollinated flowers (arrow heads). (D) Fruits at advanced stages of development with active PPN (arrow) and a still active post-floral nectary after three months of corolla abscission of a non-pollinated flower (arrow head).

Ant exclusion experiment

To test the role of ants in fruit defense, we conducted exclusion experiments that allowed us to compare plant reproductive success (i.e., fruit and seed formation) at different conditions (presence and absence of ants) in the same plant. In December 2014, we tagged 42 randomly marked plants. In each plant we chose two branches with flower buds and randomly assigned them as control (free access of ants) or treatment (ants excluded). Ants were prevented to access the PPNs of fruits by applying a nontoxic resin (TanglefootTM) on the branch basis. Branches or leaves that could be used by ants as bridge to access the experimental branches were removed. We assessed ant effectivity by comparing the number of seed predators per fruit, number of fruits started, i.e., number of fruits in the initial stage of development, number of developed fruits, i.e., fully developed fruits in pre-mature stage, and the mean number of seeds per fruit between the treatment (ants excluded) and control (free access of ants) branches. At the end of the fruiting season (from March to April of 2015) pre-mature fruits were collected and kept on plastic containers, for approximately one month, until the emergence pre-dispersal seed predators. In addition, we checked all the fruits for the presence of dead larvae and insects that did not emerge.

To test the influence of the number of nectaries on ant effectiveness, we quantified the total number of nectaries on each individual plant. We considered the total number of flowers as a proxy for nectary abundance since our observations indicated that even those nectaries from ovaries that do not develop into fruits remain active during the period fruit development (see Fig 1).

Plant reproductive success

The reproductive success was evaluated by the proportion of fruits started (number of fruits in the initial stage of development / total number of flowers produced per plant), proportion of developed fruits (number of pre-mature fruit / number of fruits started) and seed

set (mean number of seeds produced per fruit). The mean number of seeds per fruit was determined on collected fruits after insect emergence in 2 to 5 fruits per treatment. Only fully developed and intact seeds were counted.

Seed predator fauna

The collected insects (adults and larvae) found on fruits were preserved in 70% ethanol and subsequently classified at the lowest taxonomic level possible. Voucher specimens were deposited in the insect collection of the Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu – SP. *Hemicolpus abdominalis* (Hustache, 1938) (Coleoptera: Curculionidae) voucher specimens were deposited in the zoology collection of the Universidade de São Paulo, São Paulo – SP, Brazil. Seed predator relative frequency was determined for each insect group on control branches. Insect infestation was estimated as the number of seed predators per fruit (i.e., total number of seed predators emerged from fruits divided by the total number of fruits collected) of a given branch of the experiment. Infestation was measured both for total number of predators and for each taxonomic category.

Ant fauna and natural history observations

To assess the PPN-visiting ant fauna, we performed weekly censuses of ant activity on control branches of all tagged plants from February to April of 2015. The observations were carried out between 08h00 and 18h00 and lasted 2 minutes per plant. On average, 10 censuses per plant were performed, totaling 14 hours of observations. Ants were collected, preserved in 70% ethanol, and identified with the aid of specialists. Voucher specimens were deposited in the insect collection of the Laboratory of pollination ecology and interaction at Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu-SP, Brazil.

We determined the frequency of visits of each ant species in the tagged plants dividing the number of times a certain species was recorded by the total number of censuses made.

Then, we considered as dominant, those ant species that occurred in most of the censuses in a particular plant, and thus had the highest visitation frequency value in a given individual plant. While recording ant visitation, we also recorded the behavior of ants and seed predators. We characterized the behavior of the PPN-visiting ants by describing the activity of each species around the nectaries, as well as their response to the herbivores. The behavior of the pre-dispersal seed predators was investigated by describing, when it was possible, their foraging and feeding habits as well as their response to encounters with ants.

Analysis

To determine whether the number of seeds per fruit is related to fruit infestation, we tested the relationship between the total number of seed predators per fruit and the mean number of seeds per fruit with a simple linear regression, and the relationship between all predators groups and the mean number of seeds per fruit with a multiple regression approach. Finally, we used a simple linear regression to define the relationship between the main seed predator (Curculionidae beetle) and the number of seeds. We used the mean number of total seed predators per fruit, the mean number of seed predators from each taxonomic category and the mean number of weevils per fruit as predictor variables and the mean number of seeds per fruit as response variable. In order to test for the occurrence of different ant composition among plants (N= 42 plants), we performed a Non-metric Multidimensional Scaling (NMDS) based on the frequency of PPN-visiting ants in each plant using Bray-Curtis distances.

We also used generalized linear mixed models (GLMM) to test the effect of ants on seed predators and plant reproductive success (i.e., proportion of fruits started, proportion of developed fruits and the mean number of seeds per fruit). We used a Gaussian model for the quantitative response variables, i.e., number of seeds per fruit, number of total seed predators per fruit and number of weevils per fruit. While for proportions of fruits started and final fruits, we used binomials models. In all cases, the treatment (ant presence / absence) was

considered as fixed effect and plant individual was assigned as random effect. We used the Akaike Information Criterion (AIC) to compare a model including treatment with a null model with the random effect only [65].

To test whether the ant effect on the number of seed predators per fruit depend on dominant ant species, we used GLMM in which plant individuals were assigned as random factors, while treatments (ant presence / absence) and dominant ant species as fixed effects. The mean number of seed predators per fruit was the response variable. We also used model selection to test whether including treatment and/or dominant ant species and the interaction between treatment and ant species improved the prediction over a null model with only random variation among plants. Ant species that appeared as dominant in only one plant were removed from the analysis.

To test the hypothesis that plants with more nectaries were also the most visited by ants, we used a simple linear regression model with the total number of nectaries (i.e., total number of flowers produced per plant) as predictor variable and total frequency of PPN-visiting ants as a dependent variable. To test whether resource availability influenced the effect of ants on plant reproductive success, we used linear mixed models and model selection. We fitted Gaussian models to predict the mean number of seeds per fruit. Plant individuals were considered as random effect and the number of nectaries and ant exclusion treatment as fixed effects. Models with all the possible combinations of the fixed effects were considered. These models were also compared with a null model including only the random effect and a fixed intercept. Then, we compared the models above by means of the AIC.

To assess whether resource availability influences the composition of the ant fauna and if composition affects plant reproductive success, we performed a Canonical correspondence analysis (CCA) using the number of nectaries and the mean number of seed per fruit as environmental matrix.

Results

Seed predator fauna

The main seed predators found on developing fruits (N=245 fruits) of control branches belong to Lepidoptera (0.97%), Diptera (7.5%), Coleoptera (43.3%) and Hymenoptera (48.2%). Hymenoptera were represented by at least two species of wasps, possibly from Ichneumonidae family, while *Hemicolpus abdominalis* (Hustache, 1938) (Coleoptera: Curculionidae) comprised 97% (N=129 specimens) of the Coleoptera. Beetles were observed in 69% of the plants, wasps in 48%, Diptera in 29% and Lepidoptera only in 7% (Table 1).

When considering all seed predators, regardless of the taxa category, we found no relationship between the number of seeds and the number of total seed predators per fruit ($R^2=0.04$, $F_{(1,40)} = 2.79$; $p=0.103$). Also, there was no relationship when we considered the effect of each seed predator group ($R^2=0.10$, $F_{(4,37)} = 2.11$; $p=0.099$). However, we found a negative relationship between the number of seeds and the number of beetles per fruit ($R^2=0.12$, $F_{(1,40)} = 6.82$; $p=0.013$; Fig 2).

Table 1. Abundance, relative frequency and mean number per fruit (\pm SD) of seed predators found in *Tocoyena formosa* fruits.

	Abundance	Relative frequency (%)	Mean number / fruit/ plant
Lepidoptera	3	0.97	0.01 \pm 0.04
Diptera	23	7.49	0.11 \pm 0.24
Coleoptera	133	43.32	0.59 \pm 0.62
Hymenoptera	148	48.21	0.60 \pm 1.48

Insects were collected on fruits from control branches (N= 245 fruits in 42 plants)

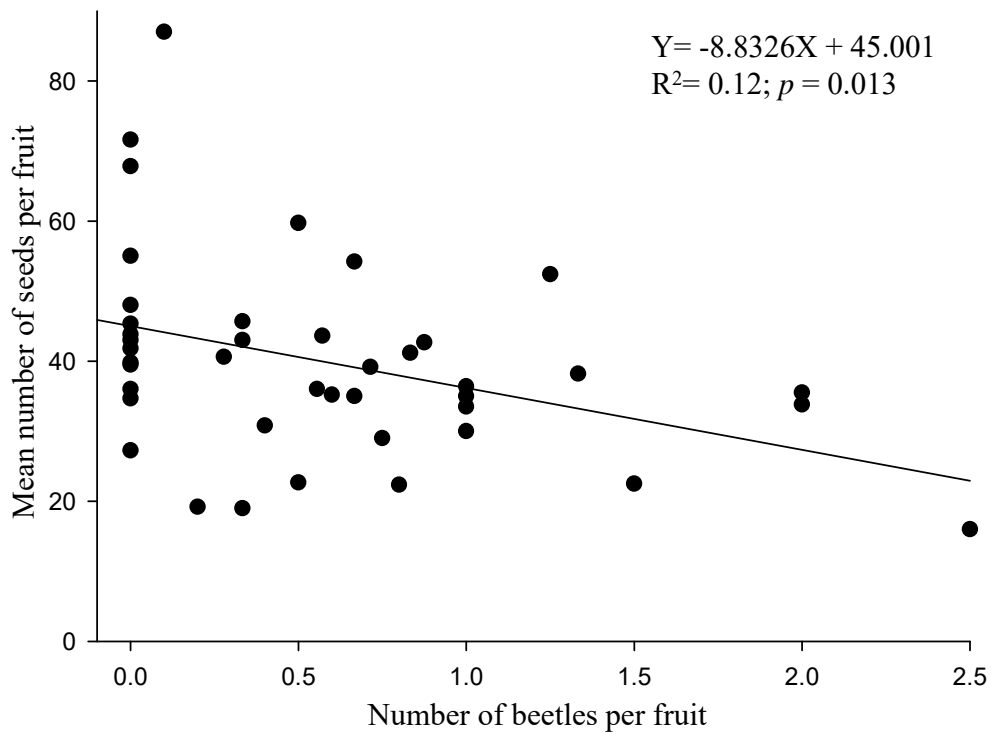


Fig 2. Relationship between the mean number of seeds per fruit and number of beetles per fruit.

Ant fauna

We recorded 10 ant species distributed in seven genera (*Ectatomma*, *Brachymyrmex* cf., *Camponotus*, *Cephalotes*, *Crematogaster*, *Neoponera*, *Pseudomyrmex*), and five subfamilies (Ectatomminae, Formicinae, Myrmicinae, Ponerinae, Pseudomyrmecinae) (Table 2). Among large (7-15 mm) and medium size ants (4-7 mm), *Ectatomma tuberculatum* (Olivier, 1792) and *Camponotus* spp. (N=225 and 223 total observed specimens) were the most abundant and frequent ants (Table 2). *Ectatomma tuberculatum* was recorded in 60% of the plants and was the dominant ant species in 55%, while *Camponotus crassus* (Mayr, 1862) occurred in 19% of the plants being the dominant species in 14%. Among the small ant species (1-3mm), *Crematogaster goeldii* (Forel, 1903) together with *Brachymyrmex* sp. aff. were the most abundant in the plants where they occurred, but they presented a low frequency in the whole population (Table 2). The first occurred in 7 plants, being the dominant species in six of them, while the second also occurred in 7 plants, but was dominant in only one plant. *Neoponera villosa* (Fabricius, 1804) was observed as a dominant species in two plants, although in only one, it occurred with relatively high frequency, though presenting a very low abundance in both plants. *Camponotus rufipes* (Fabricius, 1775) was dominant in two plants. *Camponotus renggeri* (Emery, 1894) and *Cephalotes* sp. were dominant in only one plant each. Although *Camponotus ager* (Smith, 1858) was observed in one plant during day censuses, it was not the dominant species. NMDS ordination showed that most differences in ant composition among plants were due to the presence of *E. tuberculatum*, *C. crassus* and *Crematogaster goeldii* (stress: 0.05) (Fig 3). Plants in which these ants occurred were most similar in composition. Generally, when one of these three ant species was present in a given plant, few or no other ant species co-occurred. Furthermore, plants visited by the other recorded species did not show clear differences on ant composition.

Table 2. Ant species observed visiting PPNs on control branches of *Tocoyena formosa*. Mean abundance (\pm SD) per plant in each census and mean (\pm SD) visitation frequency per plant.

Ants	Mean abundance per plant	Mean visitation frequency
<i>Ectatomma tuberculatum</i> (Olivier, 1792)	0.46 \pm 0.63	0.27 \pm 0.29
<i>Camponotus crassus</i> (Mayr, 1862)	0.34 \pm 0.86	0.10 \pm 0.25
<i>Crematogaster goeldii</i> (Forel, 1903)	0.76 \pm 2.03	0.05 \pm 0.13
<i>Camponotus rufipes</i> (Fabricius, 1775)	0.08 \pm 0.36	0.03 \pm 0.16
<i>Brachymyrmex</i> sp. aff.	0.74 \pm 2.01	0.03 \pm 0.08
<i>Neoponera villosa</i> (Fabricius, 1804)	0.02 \pm 0.09	0.02 \pm 0.09
<i>Cephalotes</i> sp.	0.06 \pm 0.22	0.01 \pm 0.06
<i>Camponotus renggeri</i> (Emery, 1894)	0.04 \pm 0.27	0.01 \pm 0.08
<i>Pseudomyrmex gracilis</i> (Fabricius, 1804)	0.01 \pm 0.04	0.01 \pm 0.03
<i>Camponotus ager</i> (Smith, 1858)	0.01 \pm 0.04	0.006 \pm 0.04

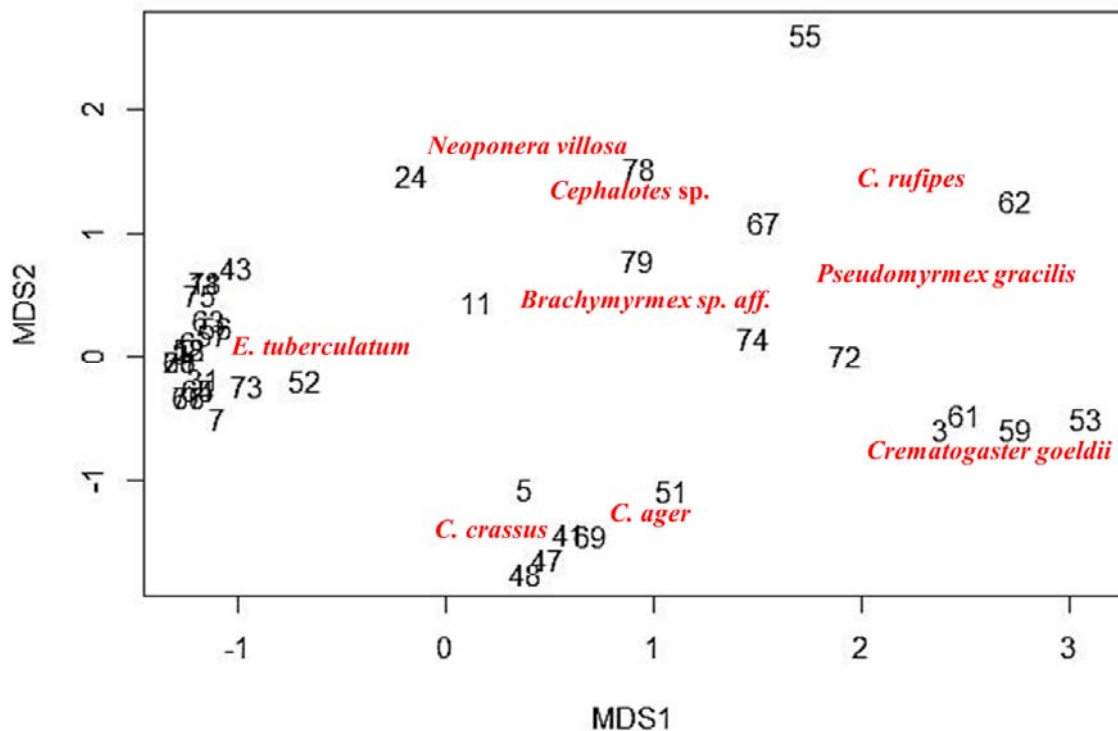


Fig 3. Non-metric multidimensional scaling (NMDS) showing individual plants dissimilarities in ant composition fauna. Plants are displayed as numbers.

E. tuberculatum and *N. villosa* were the largest *T. formosa* PPN-visiting ants. *N. villosa* was never observed foraging in groups, neither attacking other insects, while *E. tuberculatum* seldom foraged in groups, although in some occasions many ants were recorded in the same branch. *E. tuberculatum* presented the most aggressive behavior and in many occasions were seen standing on the fruits with their antennae and mandibles held wide open (Fig 4A). In some occasions this position preceded attacks to other insects which approached the fruits. We recorded antagonistic behavior toward flies and an effective predation of *H. abdominalis* (Fig 4B). However, in most cases this behavior did not result in prey capture. *C. crassus* were classified as a medium sized ant and foraged mainly in groups of two or three individuals. They were more active and present a more exploratory behavior on branches and fruits when compared to *E. tuberculatum*. Although they were not as aggressive as *E. tuberculatum* in some cases these ants were observed attacking flies on the fruits. Among the small sized ants, few agonistic interactions were recorded, but we recorded them attacking another ant species (*Cephalotes* sp.) and a Lepidoptera larva once.

During day censuses, *H. abdominalis* weevils were seen ovipositing inside holes which they made with their mouth parts on fruit pericarp, that caused visible damage on fruits (Fig 4C). Despite this, the incidence of weevils apparently did not affect the presence of other predator groups, since we recorded the simultaneous presence of different groups in the same fruit. Weevil larvae feed on seeds and each larva consumed more than one seed per fruit. Although a single fruit could bear up to four larvae, most fruits harbored only one or two. The larvae pupated inside the fruit and after reaching the adult phase perforated the pericarp and left the fruit (Fig 4D). However fruits infested by weevil larvae usually reached full development.

Moth larvae were the largest in size seed predators found in *T. formosa* developing fruits. These insects presented the greatest potential of fruit and seed damage, as some infested fruits had 100% of the seeds consumed which always led to fruit abortion. Adults of

flies were also observed feeding on the PPNs and, when they occurred in high abundances, their larvae could consume all fruit pulp and seeds, also leading to fruit abortion. Wasp oviposition on fruits also occurred during daylight (Fig 4E) and their larvae fed exclusively on a single seed throughout their whole development (Fig 4F). We found up to 20 wasp larvae in a single fruit, and after development into adults, wasps left the fruit by perforating its pericarp without causing fruit abortion.

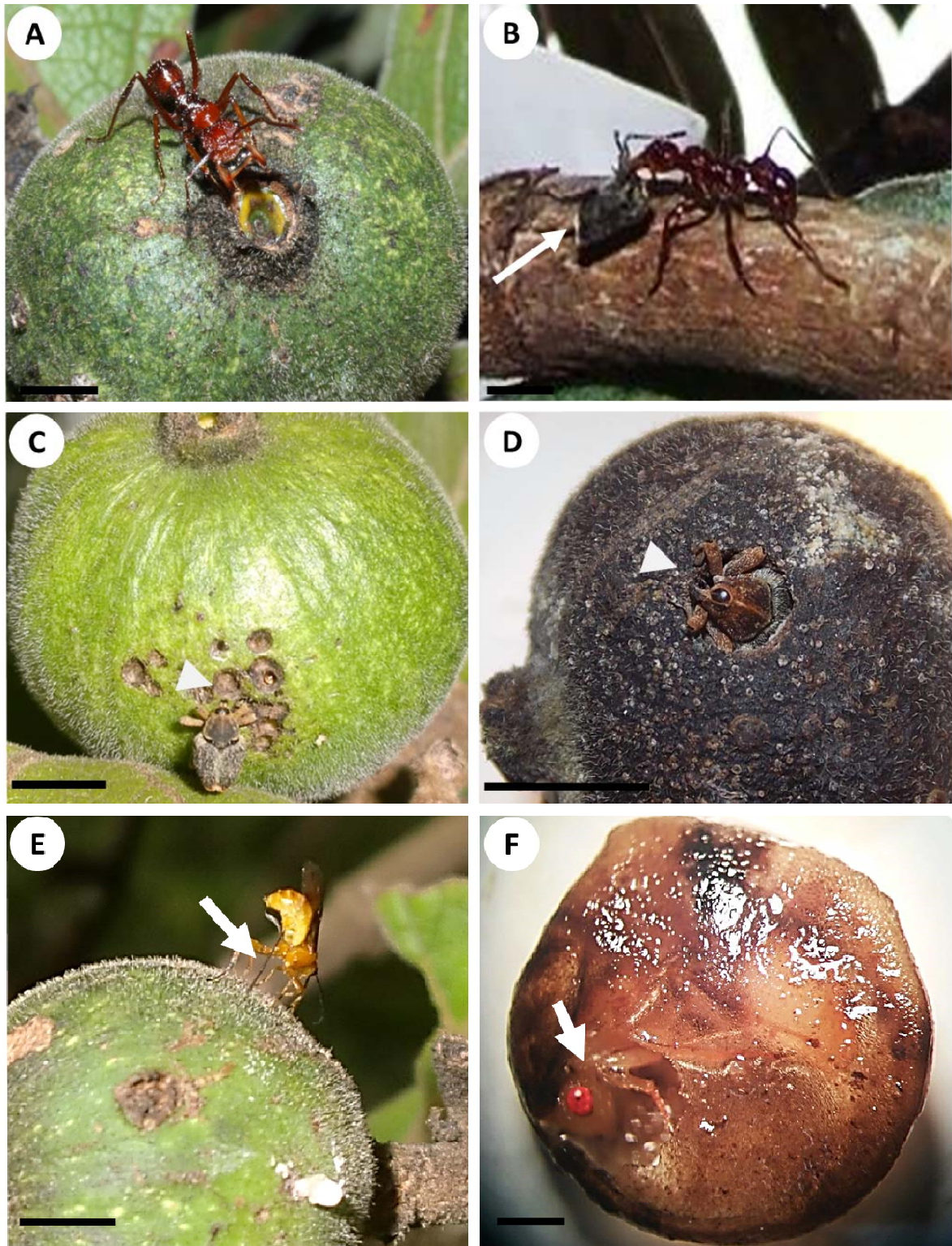


Fig 4. *Tocoyna formosa* interactions with the most aggressive ant species and pre-dispersal seed predators. (A) *E. tuberculatum* with its jaws open on a *T. formosa* fruit. (B) *E. tuberculatum* preying on and carrying the most common seed predator of *T. formosa*, the weevil *H. abdominalis* (arrow). (C) *H. abdominalis* perforating the fruit pericarp with its

rostrum. (D) An adult of *H. abdominalis* emerging from the fruit. (E) A wasp ovipositing in a *T. formosa* fruit, arrow showing its ovipositor. (F) An adult wasp emerging from a seed (arrow). Scale: A, B, C, D, E–5 mm; F–1 mm.

Ant effect on seed predators and plant reproductive success

The number of total seed predators per fruit was not affected by the presence of ants (branches without ants: 1.25 ± 1.32 ; branches with ants: 1.30 ± 1.62) (Fig 5A). Also, there was no effect of ants on the occurrence of weevils (without ants: 0.64 ± 0.58 ; with ants: 0.59 ± 0.62 ; Fig 5B). Thus, regardless of the occurrence of ants, fruits presented similar levels of seed predator infestation. Furthermore, neither the initial proportion of fruits produced (without ants: 0.46 ± 0.20 ; with ants: 0.47 ± 0.16) nor the final (without ants: 0.89 ± 0.17 ; with ants: 0.91 ± 0.13) were affected by the presence of ants (Fig 6A). Finally, we found no differences on the mean seed number per fruit between branches with (39.83 ± 14.16) or without ants (39.44 ± 17.69 ; Fig 6B). In all cases the null model presented the lowest AIC value (Table 3). The effect of ants on the number of seed predators per fruit did not depend on the dominant ant species, as the null model performed better than the ones that included both the effect of treatment and ant species (Table 4). All these results agree that ants had no effect on plant reproductive success. Also, we found no influence of the total number of nectaries per plant on ant visitation frequency (Fig 7). Nectary abundance did not influence ant effectiveness in plant defense, since models not including the effect of ant occurrence performed better than those that included (Table 5). CCA analysis also showed no relationship between variations in nectary abundance and ant fauna composition, which in turn, did not affect plant reproductive success (Fig 8).

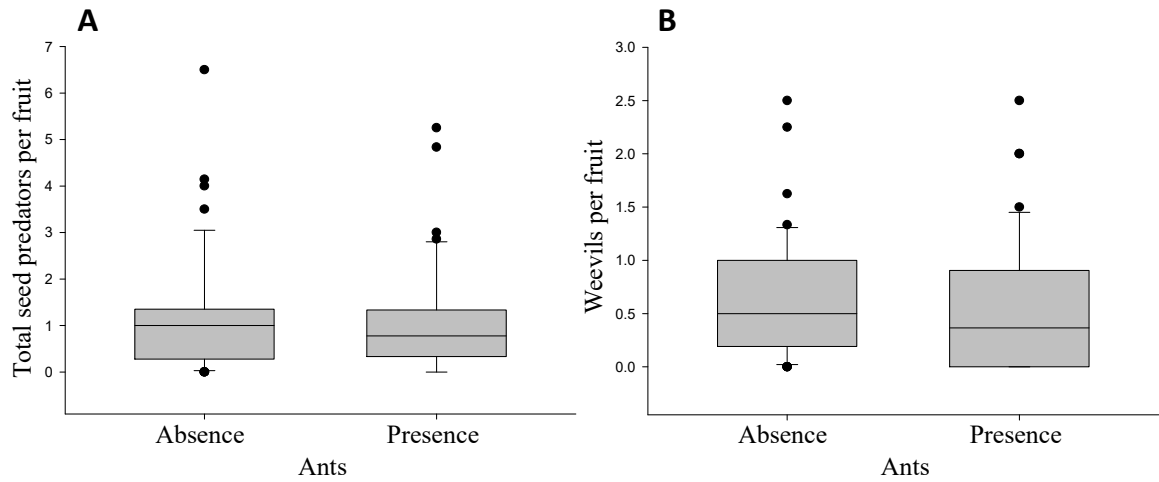


Fig 5. Results of the ant exclusion experiment on fruit infestation.

(A) Ant effect on the total number of seed predators per fruit and (B) on the number of weevils per fruit, in fruits of branches without and with ants (N = 42 plants).

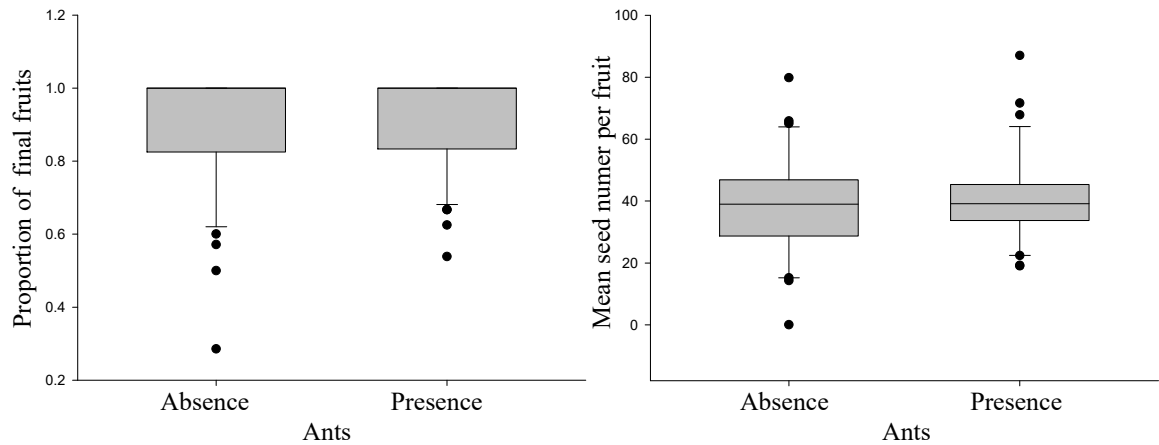


Fig 6. Results of the ant exclusion experiment on fruit production.

(A) Ant effect on the proportion of developed fruits and (B) on the mean number of seeds per fruit, in branches without and with ants (N = 42 plants).

Table 3. Models testing ant effect on seed predators and plant reproductive success. Comparison of models including the effects of treatment (with and without ants) and a null model with the random effect only.

Models	AIC	ΔAIC	d.f.
Total seed predators per fruit			
Model with treatment	303.5	2.2	4
Null Model	301.6	0.0	3
Weevils per fruit			
Model with treatment	157.3	2.0	4
Null Model	155.5	0.0	3
Proportion of started fruits			
Model with treatment	397.4	1.8	3
Null Model	395.7	0.0	2
Proportion of developed fruits			
Model with treatment	204.1	1.3	3
Null Model	203.0	0.0	2
Mean seed number per fruit			
Model with treatment	3389.5	1.7	4
Null Model	3387.8	0.0	3

Table 4. Models testing the effect of dominant ant species on the number of seed predators per fruit. Comparison of models including the effects of treatment (with and without ants), dominant ant species and the interaction between treatment and dominant ant species with a null model with the random effect only.

Models	AIC	ΔAIC	d.f.
Treatment + Dominant ant species + Interaction	286.3	5.6	12
Treatment + Dominant ant species	291.0	7.6	8
Treatment	287.1	2.2	4
Null Model	285.1	0.0	3

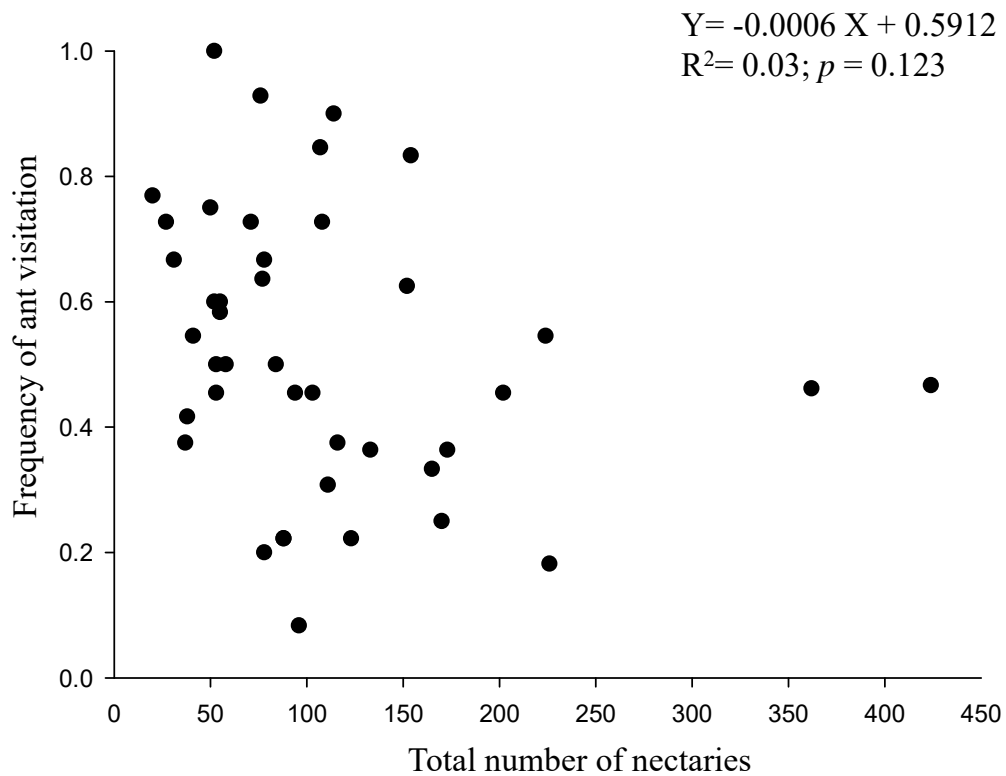


Fig 7. Relationship between the total number of nectaries and the frequency of ant visitation.

Table 5. Ant exclusion experiment and nectary effect on mean seed number per fruit. Comparison of models including the effects of treatment (with and without ants), nectary abundance and interaction between treatment and nectary with a null model with the random effect only.

Models	AIC	ΔAIC	d.f.
Treatment + Nectaries + Interaction	705.7	2.7	6
Treatment + Nectaries	705.6	2.2	5
Treatment	706.7	3.1	4
Nectaries	703.6	0.0	4
Null Model	704.7	0.9	3

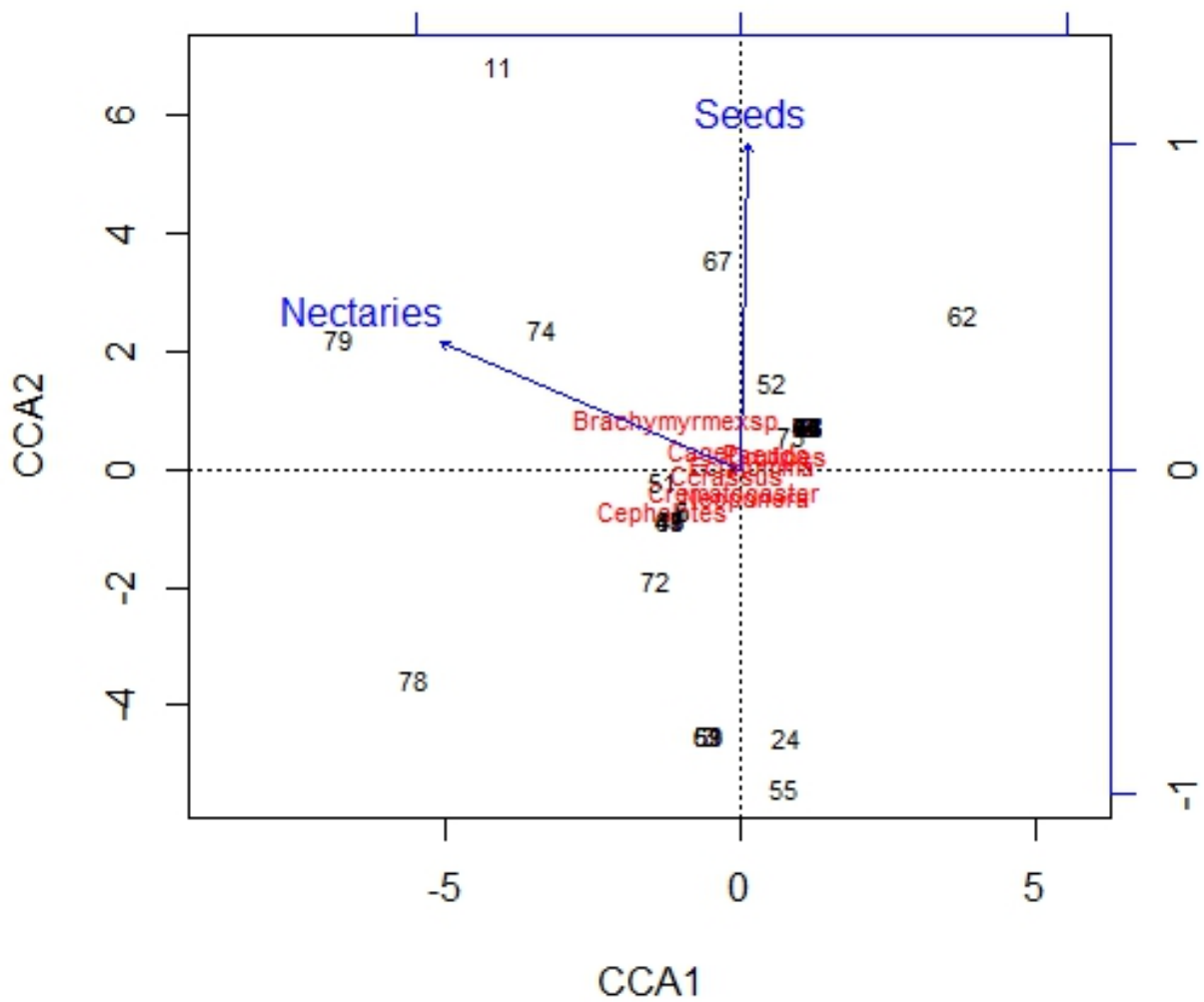


Fig 8. Canonical correspondence analysis (CCA). Diagram showing the ordination of individual plants according to ant species composition, nectary abundance and mean number of seeds per fruit. Individual plants are displayed as numbers.

Discussion

Although we have hypothesized that the presence of pericarpial nectaries would represent an indirect defense mechanism against pre-dispersal seed predators, *T. formosa* PPN-attracted ants did not reduce seed predation nor increased plant reproductive success. Neither the large and aggressive ants nor the abundance of nectaries affected ant performance on protecting seeds. Developing seeds suffered predation mainly due to the activity of weevils and wasps larvae. Although, infestation by seed predators did not result in fruit abortion most of time, increasing beetles number per fruit led to a decreasing number of seeds, indicating that *H. abdominalis* is the most important pre-dispersal seed predator of *T. formosa*. To the best of our knowledge, this is the first study to report the behavior and feeding habits of this weevil, which might present host specific oviposition preferences.

Similarly to our results, Del-Claro et al. [50] found that the interaction with ants mediated by the PPNs of *Palicourea rigida*, another Rubiaceae species, did not provide protection from seed-parasitic wasps. Instead they concluded that ants have an indirect effect on plant reproductive success by protecting leaves against foliar herbivores. In another population of *T. formosa* in Minas Gerais state, southeastern Brazil, Santos and Del-Claro [52] also did not find any differences in plants with and without ants. However, in *Mentzelia nuda* (Loasaceae) there was a positive effect of ants on pods and seed formation, which suggest that PPN-ant associations may represent an effective strategy of seed defense against pre-dispersal predators [19].

The absence or the reduced effectiveness of ants in protecting plants against herbivores may be related to the facultative nature of the ant-plant interaction mediated by EFNs [4, 7, 28, 29]. In some cases, however, effectiveness in plant defense against herbivores depends on the composition of the ant fauna [25], being protection related to ant size and/or recruitment capacity [9, 16]; but see also [66]. Here, though the dominant ant species differed in size and foraging behavior among individual plants, they did not effectively protected the

developing seeds in any case. Seed protection was ineffective even in those plants dominated by *E. tuberculatum*, which is reported as a highly aggressive ant species see [67, 68] and very effective in flower and fruit protection in other species [16]. However, in other Cerrado areas, ant benefits on plant reproductive success is reported to be temporal variable, with different ant species being associated with higher seed production in successive years [42].

Camponotus spp. are among the most common and effective EFN-visiting ants in the Brazilian Cerrado [14, 17, 69]. Nevertheless, in some systems they fail to protect plants against foliar and flower herbivores [33, 34, 70], and also against seed predators [50]. Indeed, the few plants dominated by *C. crassus* did not show lower fruit infestation by seed predators. Maybe the fact that only few plants were dominated by *C. crassus* might have hampered the detection of positive effects. However, in another *T. formosa* population which presented a higher frequency of *C. crassus*, this species did not provide plant protection from seed consumers or foliar herbivores [52].

The identity and behavior of the most important seed predator may also have accounted for the absence of ant protection, since specialized antagonists can present adaptations to escape plant defenses [71]. The sclerotized body of weevils may provide protection against ant attack [26, 33]. For instance, Alves-Silva et al. [33] recorded that *C. blandus* attacks to florivorous beetles never resulted in weevil injury or predation. However, the sclerotized body alone may not account for all beetle immunity, since ants are very effective against beetles in other systems [11, 16, 19, 32]. In the case of *Hemicolpus abdominalis* weevil, we observed once, the production of a drop-like secretion by the weevil pygidium after an encounter with an *Ectatomma* sp., which resulted in the ant leaving the branch without disturbing the beetle. As observed for other groups like sawflies and trips, we suspect that this secretion may have a repellent effect on ants (see [21, 34]). Additionally, the endophytic habit of these beetles could also have negatively influenced ant effectiveness because the larvae which develop inside fruits are out of the reach of ants, and thus ant

protection may only take place when ants directly interfere with oviposition [24, 26]. Another mechanism by which antagonists usually escape ant attack is related to the behavioural ability of seed predators to avoid ants [21, 34]. When visiting the PPNs of large fruits, ants usually are positioned on the top of the fruit where the PPNs are located, and thus may not notice insects located at the base of the fruit. However, despite of the defense strategies of weevils, as we observed in the *T. formosa*, sometimes aggressive ants as *E. tuberculatum* can successfully prey upon *H. abdominalis* weevils.

Despite the fact that intrinsic differences in the amount of reward among plants can influence ant visitation frequency and the ant-plant interaction outcome [35, 70, 72], our results indicate that neither ant visitation frequency nor their effect on plant reproduction were influenced by the abundance of nectaries. On the other hand, since plants can concentrate nectar production in more vulnerable periods of plant development, like the initial stage of fruit development [46, 51], we suggest that further studies should explore the existence of differences in nectar production in different ontogenetic stages of fruit development in *T. formosa*.

Variations in resource abundance between plants also had no effect on ant fauna composition inhabiting *T. formosa* plants. Similarly, Dáttilo et al. [69] did not find any relationship between EFN abundance and ant richness in three Cerrado plant species. Instead, as we observed in *T. formosa*, they found that few dominant ant species were the main visitors in most plants. Although competitively superior species are thought to compete for higher quality plants [9, 44, 60], neither the presence nor the frequency of *E. tuberculatum* were related to nectar availability. Finally, ant composition had no effect on seed set, indicating that even when considering the amount of reward and the ant fauna composition together no differences in seed set due to ant presence were detected.

Although plants are expected to invest more in defense of structures directly related to reproduction [e.g., 43, 73,] the presence of nectar secreting structures that attract aggressive

ants to developing fruits of *T. formosa* did not provide protection against pre-dispersal seed predators during the reproductive period studied. Though we cannot rule out these results, a possible explanation is that this absence of protection reflects the great conditionality of facultative mutualisms [28]. In this sense the low interaction intimacy of this facultative ant-plant association, i.e., ants do not rely exclusively on *T. formosa* for energetic provision, predicts that the interaction outcome can be highly variable [4, 41]. Even though *T. formosa* apparently invests in high amounts of resources for the mutualists, this ant-plant association does not seem to represent an exception from the notion that facultative ant-plant interactions are highly variable [28]. However, at species level, the prevalence of large ants between most of *T. formosa* individuals support the existence of links between plant traits and ant composition, since plant species with higher amounts of nectar may better fit the higher energetic requirements of large and competitively superior ants [9].

Our observations could also indicate that the absence of protection may be related to seed predator characteristics which may confer to weevils, protection against ants. On the other hand, at the community level, yet to be explored factors, such as reward quality [38], local ant abundance [22, 74], ant colony characteristics [8, 58, 67], abiotic factors [41] or the presence of alternative energetic sources [35, 58] could also account for variations in ant frequency, composition and ant protective effects [44, 60]. Furthermore, an interesting approach would be to investigate whether this lack of protection entails cost for plants, i.e., balance of cost and benefits of ant-plant association [e.g., 70] and whether these results are consistent in space and time.

During the year of study the high fruit set observed in the population of *T. formosa* could have decreased the importance of seed predators [24]. Indeed, ants might be more effective in conditions of low fruit formation, since fruits can be better defended. In this occasion, the prevalence of active nectaries from ovaries that do not develop into fruits may guarantee the presence of ants even in conditions of low fruit production. Though, here we do

not have information on whether the permanence of post-floral nectaries depends on the presence of developing fruits in the same inflorescence. In addition, because pollinator fauna is prone to spatio-temporal fluctuations, in especial long-tongued hawkmoths [75, 76], fruit set can be highly variable, especially in highly specialized long-tubed flowers which depend on specific pollinators [77, 78]. Additionally, pre-dispersal seed predators may also be highly variable in time [79]. Thus, we speculate that ant defense could be more necessary and important in periods of low fruit formation and higher seed predation.

References

1. Bentley BL. Extrafloral nectaries and protection by pugnacious bodyguards. *Annu. Rev Ecol Syst.* 1977; 8: 407–428.
2. Beattie AJ. The evolutionary ecology of ant-plant mutualisms. Cambridge: Cambridge University Press Cambridge; 1985.
3. Bronstein JL. The contribution of ant-plant protection studies to our understanding of mutualism. *Biotropica.* 1998; 30: 150–61.
4. Rosumek FB, Silveira FAO, Neves FS, Barbosa NPU, Oki LDY, Pezzini F, et al. Ants on plants: a meta-analysis of the role of ants as plant biotic defenses. *Oecologia.* 2009; 160: 537–549.
5. Heil M, McKey D. Protective ant-plant interactions as model systems in ecological and evolutionary research. *Ann Rev Ecol Evol Syst.* 2003; 34: 425–453.
6. Heil M, Greiner S, Meimberg H, Krüger R, Noyer JL, Heubl G, Linsenmair KE, Boland W. Evolutionary change from induced to constitutive expression of an indirect plant resistance. *Nature.* 2004; 430: 205–208.
7. Koricheva J, Romero GQ. You get what you pay for: reward-specific trade-offs among direct and ant-mediated defenses in plants. *Biol Lett.* 2012; 8: 628–630. doi:10.1098/rsbl.2012.0271
8. Koptur S, Jones IM, Pena JE. The influence of host plant extrafloral nectaries on multitrophic interactions: an experimental investigation. *PLoS ONE.* 2015; 10: e0138157.
9. Nogueira A, Rey PJ, Alcántara JM, Feitosa RM, Lohmann LG. Geographic mosaic of plant evolution: extrafloral nectary variation mediated by ant and herbivore assemblages. *PloS ONE.* 2015; 10:e0123806.
10. Koptur S. Experimental evidence for defense of *Inga* (Mimosoideae) saplings by ants. *Ecology.* 1984; 65: 1787–1793.
11. Del-Claro K, Berto V, Réu W. Effect of herbivore deterrence by ants increase fruit set in an extrafloral nectary plant, *Qualea multiflora* (Vochysiaceae). *J Trop Ecol.* 1996; 12: 887–892.
12. Koptur S. Nectar as fuel for plant protectors. In: Wackers FL, Van-Rijn PCJ, Bruin J, editors. Plant provided food for carnivorous insects: a protective mutualism and its applications. Cambridge: Cambridge University Press; 2005. pp. 75-108.
13. Koptur S. Facultative mutualism between weedy vetches bearing extrafloral nectaries and weedy ants in California. *Am J Bot.* 1979; 66: 1016–1020.

14. Nascimento EA, Del-Claro K. Ant visitation to extrafloral nectaries decreases herbivory and increases fruit set in *Chamaecrista debilis* (Fabaceae) in a Neotropical savanna. *Flora*. 2010; 205: 754–756.
15. Schemske DW. The evolutionary significance of extrafloral nectar production by *Costus woodsonii* (Zingiberaceae): an experimental analysis of ant protection. *J Ecol*. 1980; 68: 953–967.
16. Rico-Gray, V. Thien LB. Effect of different ant species on reproductive fitness of *Schomburgkia tibicinis* (Orchidaceae). *Oecologia*. 1989; 81: 487–489.
17. Oliveira PS. The ecological function of extrafloral nectaries: Herbivore deterrence by visiting ants and reproductive output in *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae). *Funct Ecol*. 1997; 11: 323–330.
18. Inouye DW, Taylor OR. A temperate region plant-ant-seed predator system: consequences of extra floral nectar secretion by *Helianthella quinquenervis*. *Ecology*. 1979; 60: 1–8.
19. Keeler KH. Function of *Mentzelia muda* (Loasaceae) postfloral nectarines in seed defense. *Am J Bot*. 1981; 68: 295–299.
20. O’Dowd DJ, Catchpole EA. Ants and extrafloral nectaries: no evidence for plant protection in *Helichrysum* spp. – ant interactions. *Oecologia*. 1983; 59: 191–200.
21. Heads PA, Lawton JH. Bracken, ants and extrafloral nectaries. III. How insect herbivores avoid ant predation. *Ecol Entomol*. 1985; 10: 29–42.
22. Rashbrook VK, Compton SG, Lawton JH. Ant-herbivore interactions: reasons for the absence of benefits to a fern with foliar nectaries. *Ecology*. 1992; 73: 2167–2174.
23. Freitas L, Galetto L, Bernardello G, Paoli AAS. Ant exclusion and reproduction of *Croton sarcopetalus* (Euphorbiaceae). *Flora*. 2000; 195: 398–402.
24. Ruhren S. Seed predators are undeterred by nectar-feeding ants on *Chamaecrista nictitans* (Caesalpineaceae). *Plant Ecol*. 2003; 166: 189–198.
25. Mody K, Linsenmair KE. Plant-attracted ants affect arthropod community structure but not necessarily herbivory. *Ecol Entomol*. 2004; 29: 217–225.
26. Koptur S, Lawton JH. Interactions among vetches bearing extrafloral nectaries, their biotic protective agents, and herbivores. *Ecology*. 1988; 69: 278–283.
27. Assunção MA, Torezan-Silingardi HM, Del-Claro K. Do ant visitors to extrafloral nectaries of plants repel pollinators and cause an indirect cost of mutualism? *Flora*. 2014; 209: 244–249.
28. Bronstein JL. Conditional outcomes in mutualistic interactions. *TREE*. 1994; 9: 214–217.

29. Barton AM. Spatial variation in the effects of ants on extrafloral nectary plant. *Ecology*. 1986; 67: 495–504.
30. Miller TEX. Does having multiple partners weaken the benefits of facultative mutualism? A test with cacti and cactus-tending ants. *Oikos*. 2007; 116: 500–512.
31. 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 Ethol*. 2010; 13: 33–38.
32. Di Giusto B, Anstett MC, Dounias E, McKey DB. Variation in the effectiveness of biotic defense: the case of an opportunistic ant-plant protection mutualism. *Oecologia*. 2001; 129: 367–375.
33. Alves-Silva E, Bächtold A, Barônio GJ, Torezan-Silingardi HM, Del-Claro K. Ant-herbivore interactions in an extrafloral nectaried plant: are ants good plant guards against curculionid beetles? *J Nat Hist*. 2014; 1: 1–11.
34. Alves-Silva E, Del-Claro K. On the inability of ants to protect their plant partners and the effect of herbivores on different stages of plant reproduction. *Austral Ecol*. 2015; doi:10.1111/aec.12307
35. Apple JL, Feener Jr DF. Ant visitation of extrafloral nectaries of *Passiflora*: The effects of nectary attributes and ant behavior on patterns in facultative ant-plant mutualisms. *Oecologia*. 2001; 127: 409–416.
36. Sobrinho TG, Schoederer JH, Rodrigues LL, Collevatti RG. Ant visitation (Hymenoptera: Formicidae) to extrafloral nectaries increases seed set and seed viability in the tropical weed *Triumfetta semitriloba*. *Sociobiology*. 2002; 39: 353–368.
37. Rudgers JA. Enemies of herbivores can shape plant traits: selection in a facultative ant-plant mutualism. *Ecology*. 2004; 85: 192–205.
38. Ness JH, Morris WF, Bronstein JL. For ant-protected plants, the best defense is a hungry offense. *Ecology*. 2009; 90: 2823–2831.
39. Heil M, Hilpert A, Krüger R, Linsenmair KE. Competition among visitors to extrafloral nectaries as a source of ecological costs of an indirect defense. *J Trop Ecol*. 2004; 20: 201–208.
40. De la Fuente MAS, Marquis RJ. The role of ant-tended extrafloral nectaries in the protection and benefit of a neotropical rainforest tree. *Oecologia*. 1999; 118: 192–202.
41. Kersch MF, Fonseca CR. Abiotic factors and the conditional outcome of an ant-plant mutualism. *Ecology*. 2005; 86: 2117–2126.

42. Del-Claro K, Marquis RJ. Ant species identity has a greater effect than fire on the outcome of ant protection system in Brazilian Cerrado. *Biotropica*. 2015; 47: 459–467.
43. Holland JN, Chamberlain SA, Horn KC. Optimal defense theory predicts investment in extrafloral nectar resources in ant-plant mutualism. *J Ecol*. 2009; 97: 89–96.
44. Miller TEX. Plant size and reproductive state affect the quantity and quality of rewards to animal mutualists. *J Ecol*. 2013; 102: 496–507.
45. Bentley BL. The protective function of ants visiting the extrafloral nectaries of *Bixa Orellana* (Bixaceae). *J Ecol*. 1977; 65: 27–38.
46. Wäckers FL, Bonifay C. How to be sweet? Extrafloral nectar allocation by *Gossypium hirsutum* fits optimal defense theory predictions. *Ecology*. 2004; 85: 1512–1518.
47. Elias TS, Prance, GT. Nectaries on the fruit of *Crescentia* and other Bignoniaceae. *Brittonia*. 1978; 30: 175–181.
48. Paiva, EAS. Ultrastructure and post-floral secretion of the pericarpial nectaries of *Erythrina speciosa* (Fabaceae). *Ann Botany*. 2009; 104: 937–944.
49. Amorim FW, Oliveira PE. Estrutura sexual e ecologia reprodutiva de *Amaioua guianensis* Aubl. (Rubiaceae), uma espécie dióica de formações florestais de cerrado. *Rev Bra Bot*. 2006; 29: 353–362.
50. Del-Claro K, Guillermo-Ferreira R, Almeida EM, Zardini H, Torezan-Silingardi HM. Ants visiting the post-floral secretions of pericarpial nectaries in *Palicourea rigida* (Rubiaceae) provide protection against leaf herbivores but not against seed parasites. *Sociobiology*. 2013; 60: 217–221.
51. Falcão JCF, Dáttilo W, Izzo TJ. Temporal variation in extrafloral nectar secretion in different ontogenic stages of the fruits of *Alibertia verrucosa* S. Moore (Rubiaceae) in a Neotropical savanna. *J Plant Interac*. 2014; 9: 137–142.
52. Santos JC, Del-Claro K. Interação entre formigas, herbívoros e nectários extraflorais em *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlechtd.) K. Schum. (Rubiaceae) na vegetação do cerrado. *Rev Bras Zoociências*. 2001; 3: 77–92.
53. Oliveira PS, Leitão-Filho HF. Extrafloral nectaries: their taxonomic distribution and abundance in the woody flora of Cerrado vegetation in southeast Brazil. *Biotropica*. 1987; 19: 140–148.
54. Oliveira PS, Oliveira-Filho AT. 1991. Distribution of extrafloral nectaries in the woody flora of tropical communities in western Brazil. In: Price PW, Lewinsohn T M, Fernandes GW, Benson WW, editors. *Evolutionary ecology of plant-animal interactions: tropical and temperate comparisons*. John Wiley & Sons; 1991. pp. 163–175.

55. Alves-Silva E, Del-Claro K. Effect of post-fire resprouting on leaf fluctuating asymmetry, extrafloral nectar quality, and ant-plant-herbivore interactions. *Naturwissenschaften*. 2013; 100: 525–532.
56. Ratter JA, Bridgewater S, Ribeiro JF. Analysis of the floristic composition of the Brazilian Cerrado vegetation III: comparison of the woody vegetation of 376 areas. *Ed J Botany*. 2003; 60: 57-109.
57. O'Dowd DJ. Foliar nectar production and Ant Activity on a neotropical tree, *Ochroma pyramidale*. *Oecologia*. 1979; 43: 233–248.
58. Lanan, MC, Bronstein JL. An ant's-eye view of an ant-plant protection mutualism. *Oecologia*. 2013; 172: 779–790.
59. Grasso DA, Pandolfi C, Bazihizina N, Nocentini D, Nepi M, Mancuso S. Extrafloral-nectar-based partner manipulation in plant-ant relationships. *AoB PLANTS*. 2015; 7: plv002.
60. Blüthgen N, Fiedler K. Competition for composition: Lessons from nectar-feeding ant communities. *Ecology*. 2004; 85: 1479–1485.
61. Oliveira-Filho AT, Ratter JA. Vegetation Physiognomies and woody flora of the Cerrado biome. In: Oliveira PS, Marquis RJ, editors. *The Cerrados of Brazil: Ecology and natural history of a neotropical savanna*. Columbia University Press; 2002. pp. 91–120.
62. CEPAGRI, Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas à Agricultura. 2015. Clima dos Municípios Paulistas. Disponível em <<http://www.cpa.unicamp.br/outrasinformacoes/clima-dos-municipios-pailistas.html>> Acesso julho 2015.
63. Silberbauer-Gottsberger I. Anthese und Bestubung der Rubiaceen *Tocoyena brasiliensis* und *T. formosa* aus dem Cerrado Brasiliens. *Österr Bot Z*. 1972; 120: 1–13.
64. Silberbauer-Gottsberger I, Gottsberger G. Über sphingophile Angiospermen brasiliens. *Plant Syst Evol*. 1975; 123: 157–184.
65. Burnham KP, Anderson DR. *Model selection and multimodel inference: a practical information-theoretic approach*. Springer; 2004.
66. Trager MD, Bhotika S, Hostetler JA, Andrade GV, Rodriguez-Cabal MA, Keon CSM, Onsenberg CW, Bolker BM. Benefits for plants in ant-plant protective mutualisms: a meta-analysis. *PLoS ONE*. 2010; 5: e14308.

67. Dejean A, Lachaud JP. Growth-related changes in predation behavior in incipient colonies of the ponerine ant *Ectatomma tuberculatum* (Olivier). *Ins Soc.* 1992; 39: 129–143.
68. Eberhard WG. Mortal mimicry in the fly, *Plocoscelus* sp. (Diptera, Micropezidae). *Biotropica.* 199; 31: 535.
69. Dáttilo W, Fagundes R, Gurka CAQ, Silva MSA, Vieira MCL, Izzo TJ, Díaz-Castelazo C, Del-Claro K, Rico-Gray V. Individual-based ant-plant networks: diurnal-nocturnal structure and species-area relationship. *PloS ONE.* 2014; 9: e99838.
70. Nogueira A, Guimarães E, Machado SR, Lohmann LG. Do extrafloral nectaries present a defensive role against herbivores in two species of the family Bignoniaceae in a Neotropical savannas? *Plant Ecol.* 2012; 213: 289–301.
71. Janzen DH. Seed predation by animals. *Annu Rev Ecol Syst.* 1971; 2: 465–492.
72. Baker-Méio B, Marquis RJ. Context-dependent benefits from ant-plant mutualism in three sympatric varieties of *Chamaecrista desvauxii*. *J Ecology.* 2012; 100: 242–252.
73. Oliveira PS, Rico-Gray V, Castillo-Guevara C, Díaz-Castelazo C. Interaction between ants, extrafloral nectaries and insect herbivores in Neotropical coastal sand dunes: Herbivore deterrence by visiting ants increases fruit set in *Opuntia stricta* (Cactaceae). *Funct Ecol.* 1999; 13: 623–631.
74. Bentley BL. Plants bearing extrafloral nectaries and the associated ant community: interhabitat differences in the reduction of herbivore damage. *Ecology.* 1976; 57: 815–820.
75. Moré M, Amorim FW, Benitez-Vieyra S, Medina AM, Sazima M, Coccuci AA. Armament imbalances: match and mismatch in plant-pollinator traits of highly specialized long-spurred orchids. *PloS ONE.* 2012; 7: 1–9.
76. Amorim, FW, Wyatt GE, Sazima M. Low abundance of long-tongued pollinators leads to pollen limitation in four specialized hawkmoth-pollinated plants in the Atlantic Rain forest, Brazil. *Naturwissenschaften.* 2014; 101: 893–905.
77. Oliveira PE, Gibbs PE, Barbosa AA. Moth pollination of woody species in the cerrados of central Brazil: a case of so much owed to so few? *Plant Syst Evol.* 2004; 245: 41–54.
78. Amorim FW, Galetto L, Sazima M. Beyond the pollination syndrome: nectar ecology and the role of diurnal and nocturnal pollinators in the reproductive success of *Inga sessilis* (Fabaceae). *Plant Biol.* 2013; 15: 317–327.

79. Kolb A, Ehrlén J, Eriksson O. Ecological and evolutionary consequences of spatial and temporal variation in predispersal seed predation. *Persp Plant Ecol Evol Sys.* 2007; 9: 79–100.

Efeito das interações multitróficas sobre a seleção mediada por polinizadores em *Tocoyena formosa* (Rubiaceae)

Priscila Andre Sanz Veiga¹, Santiago Benitez-Vieyra², Felipe Wanderley Amorim³

¹ Programa de Pós Graduação em Botânica, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, São Paulo, Brasil.

² Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (CONICET) Universidad Nacional de Córdoba, Ciudad de Córdoba, Córdoba, Argentina.

³ Departamento de Botânica, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, São Paulo, Brasil.

¹ Manuscrito em preparação para ser submetido ao periódico OIKOS

RESUMO

As plantas interagem simultaneamente com mutualistas e antagonistas, e o efeito dessas interações pode influenciar tanto na força, quanto na direção das pressões seletivas atuando sobre os caracteres florais. Em *Tocoyena formosa* (Rubiaceae) a variação interindividual na morfologia floral sugere que os caracteres florais podem estar sujeitos à seleção natural imposta por polinizadores. Entretanto, a ação de predadores de sementes pré-dispersão pode influenciar o resultado da seleção imposta pelos polinizadores através do êxito reprodutivo feminino – ERF (i.e. formação de frutos e sementes). Por outro lado, os frutos em desenvolvimento possuem nectários pós-florais que atraem formigas, cuja interação mutualística pode diminuir a atividade de antagonistas. Neste contexto, nós quantificamos o efeito da morfologia floral, dos mutualistas e antagonistas sobre o êxito reprodutivo feminino e determinamos o efeito das interações multitróficas sobre a seleção fenotípica mediada pelos polinizadores. Os resultados dos experimentos de exclusão em conjunto com a análise de caminho e modelagens de equações estruturais evidenciaram que o comprimento do tubo da corola possui um efeito importante sobre o ERF em decorrência da interação com polinizadores. Ante a ausência de efeito das formigas, os predadores tiveram um efeito negativo sobre o ERF através de sua influência sobre a formação de sementes. Entretanto, o efeito positivo dos polinizadores sobre o *fitness* da planta através do número de frutos produzidos superou o efeito negativo dos predadores de sementes. As análises de seleção fenotípica mostraram que, apesar do efeito negativo dos predadores, tais antagonistas não interferem na seleção imposta por polinizadores sobre o comprimento do tubo floral. O transporte e transferência dos grãos de pólen em massas discretas na probóscide das mariposas favorece o fluxo de pólen entre flores cujo tubo da corola é igual ou maior que o tubo da flor doadora, sugerindo que plantas com tubos maiores atuam principalmente como receptoras de pólen na população e são favorecidas via êxito reprodutivo feminino. Por outro lado, as evidências sugerem que a pressão seletiva operando através do componente masculino do *fitness* pode cancelar o efeito da seleção imposta através do componente feminino do *fitness*. Finalmente, além do efeito dos polinizadores e antagonistas evidenciado através do componente feminino do êxito reprodutivo da planta, o resultado da seleção imposta sobre o comprimento do tubo floral pode depender do balanço final da seleção imposta através de ambos os componentes, masculino e feminino, do êxito reprodutivo.

INTRODUÇÃO

Polinizadores são tidos como os principais agentes seletivos da morfologia floral (Stebbins 1970, Dodd et al. 1999, Kay et al. 2006). Estudos recentes têm demonstrado que caracteres florais associados à atratividade e ao ajuste morfológico com os polinizadores, tais como, número de flores, tamanho, forma, cor, produção de néctar e fenologia representam respostas adaptativas diretas aos visitantes florais (Fenster et al. 2004, Harder & Johnson 2009). Caracteres como longos tubos da corola e esporões atuam no ajuste morfológico entre a planta e o polinizador, logo, estão sujeitos à seleção natural imposta pelos polinizadores (Maad 2000, Alexandersson & Johnson 2002, Pauw et al. 2009). Para explicar a evolução de longos tubos florais através da seleção natural, Darwin (1862) propôs que plantas cujo comprimento da corola permitisse maior ajuste morfológico com o visitante floral teriam maior eficiência da polinização e êxito reprodutivo. Dessa forma, as pressões exercidas por polinizadores com longas probóscides levariam ao alongamento progressivo do tubo floral. Posteriormente, diversos estudos corroboraram a existência de relação positiva entre o comprimento do tubo floral e o sucesso reprodutivo das plantas (Nilsson 1988, Johnson & Steiner 1997, Maad 2000, Alexandersson & Johnson 2002, Pauw et al. 2009, Moré et al. 2012) confirmando o papel dos polinizadores como agentes seletivos da morfologia floral.

Por outro lado, o *fitness* das plantas está sujeito à ação simultânea de mutualistas e antagonistas e não ao efeito isolado de um tipo de interação (revisão em Strauss & Irwin 2004). Herbívoros podem reduzir a área foliar e conseqüentemente a capacidade fotossintética da planta. Predadores de sementes ainda em desenvolvimento no fruto (daqui em diante predadores de sementes pré-dispersão) se alimentam diretamente das sementes. Dessa forma, ao danificar os tecidos vegetativos ou reprodutivos, antagonistas produzem um impacto negativo direto sobre o *fitness* da planta (Strauss et al. 1996, Herrera 2000, Ehrlén et al. 2002, Kolb et al. 2007), mas, também podem ter um efeito indireto, caso influenciem a interação com os polinizadores (Mothershead & Marquis 2000). Assim, tais antagonistas podem exercer pressões seletivas diretamente sobre os caracteres florais (Galen & Cuba 2001, Cariveau et al. 2004, McCall & Irwin 2006, Parachnowitsch & Caruso 2008, Pérez-Barrales et al. 2013) ou indiretamente ao danificar caracteres florais relacionados à atratividade dos polinizadores, como o display ou a morfologia floral (Strauss et al. 1996, Mothershead & Marquis 2000). Logo, podem influenciar tanto na força, quanto na direção das pressões seletivas sobre os caracteres florais ou até mesmo anular a seleção imposta pelos polinizadores (Gómez & Zamora 2000, Galen & Cuba 2001, Gómez 2003, Strauss & Irwin 2004, Strauss & Whittall 2006, Pérez-Barrales et al. 2013).

Predadores de sementes pré-dispersão dependem da formação de frutos e sementes para o desenvolvimento das larvas, logo, atuam diretamente sobre o componente materno do *fitness* (Brody & Mitchell 1997, Kolb et al. 2007). Nesse sentido, o resultado líquido da pressão seletiva imposta pelos polinizadores através do componente materno do *fitness* vai depender da presença e da magnitude do efeito dos antagonistas (Herrera 2000, Cariveau et al. 2004, Toräng et al. 2008). Embora isso sugira que mudanças evolutivas no fenótipo floral são determinadas pelo efeito de mutualistas e antagonistas (Strauss & Whittall 2006), poucos estudos têm abordado o efeito conjunto das interações com polinizadores e predadores de sementes na evolução da morfologia floral (Herrera 1993, Gómez 2003, 2008, Cariveau et al. 2004, Parachnowitsch & Caruso 2008, Toräng et al. 2008, Pérez-Barrales et al. 2013).

Tocoyena formosa (Cham. & Schltdl.) K. Schum. (Rubiaceae) é uma espécie esfingófila, autoincompatível completamente dependente de polinizadores, i.e. mariposas da família Sphingidae com probóscide longa (> 6,0 cm, veja Silberbauer-Gottsberger 1972, Silberbauer-Gottsberger & Gottsberger 1975, Oliveira et al. 2004) para sua reprodução. A variação interindividual na morfologia floral em populações da espécie sugere que os caracteres florais podem estar sujeitos à seleção natural imposta por polinizadores. Entretanto, a reprodução de *T. formosa* é afetada pela ação de antagonistas, uma vez que durante o desenvolvimento dos frutos as sementes são intensamente predadas por larvas de diversas ordens de insetos. A atividade destes insetos, por sua vez, pode interferir no resultado da seleção imposta pelos polinizadores através do êxito reprodutivo feminino (ERF), i.e. produção de frutos e sementes. Por outro lado, os frutos em desenvolvimento de *T. formosa* possuem nectários pós-florais pericárpicos (NPPs), i.e. nectários florais persistentes nos frutos, que atraem formigas que supostamente conferem proteção contra os predadores de sementes pré-dispersão (veja Keeler 1981, Santos & Del-Claro 2001, Del-Claro et al. 2013). Dessa forma, formigas podem influenciar o efeito líquido dos antagonistas sobre o ERF.

Nesse contexto, é provável que a força e a direção da seleção natural mediada pelos polinizadores através do componente materno do *fitness* dependam do efeito da atividade dos predadores de sementes e das formigas sobre a produção de frutos e sementes. Logo, o presente estudo teve como objetivos, (i) testar o efeito de polinizadores, predadores de sementes pré-dispersão e formigas mutualistas sobre a formação de frutos e sementes em *T. formosa*, (ii) determinar a importância simultânea dos caracteres florais, dos mutualistas e antagonistas para a reprodução de *T. formosa*, (iii) estimar a seleção natural imposta por polinizadores sobre os caracteres florais e (iv) testar o efeito de predadores de sementes pré-dispersão e formigas sobre a seleção imposta pelos polinizadores. Para isso, testamos experimentalmente o efeito isolado de polinizadores, predadores de sementes pré-dispersão e

formigas sobre o êxito reprodutivo feminino da espécie. Através de análise de caminhos (*path analysis*) e de modelos de equações estruturais (SEM) avaliamos a importância dos caracteres florais para o *fitness* da planta (i.e. produção de sementes) através de vias envolvendo tanto os mutualistas, quanto os antagonistas. Finalmente estimamos a força e direção da seleção natural imposta por mutualistas e antagonistas sobre o comprimento do tubo floral, através do componente feminino do êxito reprodutivo.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo e caracterização da espécie

O estudo foi realizado na Reserva de Cerrado “Palmeira da Serra”, um fragmento de 224 ha, localizado na Fazenda Palmeira da Serra, propriedade particular situada no município de Pratânia - SP (S 22°48’2” - W 48°44’8”), com altitude entre 714 e 753 m acima do nível do mar, e cujas vegetações predominantes são o cerradão e o cerrado *stricto sensu*. O clima do município é temperado úmido (Cwa segundo a classificação de Köppen, 1948), caracterizado por duas estações bem definidas, sendo um inverno frio e seco, entre os meses de junho e agosto, e um verão quente e úmido, entre os meses setembro e maio. A temperatura e precipitação média anual são respectivamente 21 °C e 1450 mm (CEPAGRI 2015).

Tocoyena formosa (Rubiaceae) é uma das espécies lenhosas mais comuns e amplamente distribuídas no bioma Cerrado (Ratter et al. 2003). A espécie tem porte arbustivo (1,5 e 3,0 m) e ocorre principalmente no cerrado *stricto sensu*. Na população estudada a floração ocorre de novembro a janeiro e o período de frutificação pode estender-se até maio. Possui flores com corolas tubulares hipocrateriforme cujo comprimento do tubo varia entre 76,81 e 134,25 mm, e apresenta distribuição normal na população (Shapiro-wilk $W = 0,995$, $P = 0,990$, $105,03 \pm 11,06$ mm, 3 a 5 flores por planta em 74 plantas; Fig. 1S material suplementar). A população apresenta baixa variação intraindividual no comprimento do tubo da corola (coeficiente de variação médio = $0,04 \pm 0,02$; $N=54$ plantas) e considerável variação interindividual (c.v. = $0,11$; $N=54$ plantas). O néctar é produzido na base do tubo da corola, a abertura da flor e emissão de odores são noturnos e a antese pode durar até quatro noites. A flor é protândrica, i.e. pólen fica disponível antes que o estigma esteja receptível, e na primeira noite o pólen é apresentado sobre os lobos estigmáticos fechados caracterizando um mecanismo de apresentação secundária de pólen. A partir da segunda noite, os lobos estigmáticos se abrem e ficam receptivos (Fig. 2S material suplementar). Este conjunto de atributos caracterizam *T. formosa* como uma das espécies de Cerrado mais especializadas à polinização por mariposas da família Sphingidae.

Fauna de polinizadores, predadores de sementes pré-dispersão e formigas associadas aos NPPs

O levantamento da fauna de polinizadores, mariposas da família Sphingidae, foi realizado através de observações focais, filmagens, registros fotográficos e coleta direta das mariposas nas flores durante o período de floração de *T. formosa*. As observações focais noturnas foram feitas a olho nu ou com auxílio de óculos de visão noturna (EyeClops, Malibu, CA, USA) de forma a evitar a perturbação aos visitantes. No total, foram realizadas 14,3 h de observações focais em cinco noites não consecutivas e uma hora de filmagem em uma única noite, nos meses de janeiro e dezembro de 2014 em dois períodos reprodutivos distintos (2014 e 2015). O comprimento da probóscide dos visitantes de *T. formosa* foi medido com auxílio de paquímetro digital nos indivíduos capturados, e aferido através de fotografias tomadas no campo, nas quais as mariposas estavam com a probóscide completamente estendida. Determinamos a frequência das visitas por hora, duração aproximada das visitas e o número mínimo de flores acessadas em cada visita para cada um dos períodos reprodutivos estudados.

Para identificar os predadores de sementes pré-dispersão, durante os meses de abril e maio de 2015, os frutos em desenvolvimento foram coletados (2 a 10 frutos por planta) antes de sua completa maturação em 42 plantas e armazenados em potes plásticos para acompanhar o desenvolvimento e emergência dos insetos (conforme Del-Claro et al. 2013). Os insetos adultos e as larvas encontradas nos frutos foram fixados em solução de etanol a 70% para posterior identificação na menor categoria taxonômica possível.

Para identificar a fauna de formigas associadas aos NPPs de *T. formosa*, acompanhamos semanalmente, durante os meses de fevereiro e abril de 2015 a atividade das formigas em 42 plantas. As observações foram realizadas entre 08h00 e 18h00. Em média foram realizados 10 censos de 2 minutos por planta, totalizando 14 horas de amostragem de formigas. Os espécimes foram coletados e fixados em solução de etanol a 70% para posterior montagem e classificação. A identificação foi realizada com auxílio de especialistas.

Desenho experimental

Durante a etapa reprodutiva compreendida entre novembro de 2014 e maio de 2015, realizamos experimentos de exclusão para testar o efeito de polinizadores, formigas e predadores de sementes isoladamente sobre a frutificação. Para tais experimentos foram selecionadas 42 plantas cujo comprimento médio do tubo da corola variou entre 76,81 e 118,31mm (c.v. = 0,10) e o número total de flores de 20 a 424 flores por planta (Tabela 1S material suplementar). Os tratamentos foram estabelecidos em quatro ramos floríferos por planta, conforme o seguinte desenho experimental (Tabela 2S material suplementar):

Tratamento 1 - frutificação após polinização sob condições naturais, exclusão de formigas e livre acesso de predadores de sementes; Tratamento 2 - frutificação após suplementação de pólen cruzado através de polinização manual em flores expostas aos polinizadores, livre acesso de formigas e livre acesso de predadores de sementes; Tratamento 3 - frutificação após suplementação manual de pólen cruzado em flores previamente isoladas dos visitantes florais, exclusão de formigas e exclusão de predadores de sementes e Tratamento 4 (controle) - frutificação sob condições naturais, livre acesso de formigas e de predadores de sementes. Para os tratamentos de polinização manual todas as flores do ramo receberam suplementação manual de pólen de um a dois doadores. Para impedir o acesso das formigas aos nectários e frutos foi utilizada cola entomológica (TanglefootTM) aplicada na base dos ramos. Para a exclusão dos predadores de sementes, os botões florais, flores e frutos em desenvolvimento foram protegidos com sacos de organza de náilon.

Em cada planta quantificamos o número total de flores produzidas e medimos o comprimento médio do tubo da corola (distância entre a base do tubo da corola e sua abertura) com paquímetro digital (erro, $\pm 0,01$) em 3 a 5 flores por indivíduo. Em cada tratamento registramos o número total de flores, número de frutos iniciados (i.e. ovários expandidos), número de frutos desenvolvidos (i.e. frutos que atingiram o completo desenvolvimento e estão em fase de maturação) e o número médio de sementes por fruto.

Efeito dos interagentes sobre a reprodução de *T. formosa*

O efeito dos distintos interagentes sobre a reprodução de *T. formosa* foi testado sobre a formação de frutos e sementes. O efeito dos polinizadores sobre o êxito reprodutivo feminino (ERF) foi quantificado através do número de frutos iniciados e número de sementes por fruto. Em janeiro de 2015, determinamos a proporção de frutos iniciados (i.e. razão entre o número total de frutos iniciados e o número total de flores produzidas) e o número médio de sementes produzidas por fruto nos ramos dos tratamentos controle e de suplementação manual de pólen (N=42 plantas). Para estimar a efetividade da polinização natural (*sensu* Freitas 2013), comparamos a proporção de frutos iniciados e o número médio de sementes por fruto entre os tratamentos controle e o tratamento de suplementação de pólen através de um test *t* de Student pareado. O número médio de sementes por fruto foi log transformado de forma a obedecer ao pressuposto da análise. Uma vez que os tratamentos diferem somente na condição de polinização manual, as diferenças observadas foram atribuídas ao efeito da polinização. Adicionalmente, estimamos o índice de eficácia reprodutiva (*sensu* Zapata & Arroyo 1978), definido como: $IER = P_o / P_s$ onde P_o é a proporção média de frutos iniciados no tratamento com polinização natural e P_s a proporção média de frutos iniciados no tratamento com

polinização manual. Determinamos a ocorrência de limitação polínica através do índice de limitação polínica (ILP), definido como: $ILP = 1 - (P_o / P_s)$ (conforme Larson & Barrett 2000). O valor do índice varia de 0 (ausência de limitação) a 1 (limitação extrema).

Uma vez que a taxa de frutos que sofreram aborto antes de completar o desenvolvimento foi homogeneamente baixa em todos os tratamentos, entre 9% e 11%, nós consideramos que tais abortos são decorrentes da capacidade de suporte da planta, e não ao efeito dos predadores de sementes. Neste sentido, o efeito dos predadores foi quantificado através do número médio de sementes por fruto (estimado em 3 a 5 frutos por ramo). Testamos o efeito dos predadores sobre o número médio de sementes por fruto através de modelos lineares mistos ajustados pelo método de máxima verossimilhança restrita (REML). Cada planta (N=42) foi considerada como fator aleatório e os tratamentos como fatores fixos.

Uma vez que formigas poderiam afetar indiretamente o êxito reprodutivo da planta através do efeito direto sobre os predadores de sementes, nós quantificamos o efeito das formigas sobre o número de predadores por fruto e também sobre o número médio de sementes produzidas por fruto. Para isso realizamos um teste *t* de Student pareado entre o tratamento controle e o tratamento de exclusão de formigas (N=42 plantas).

Influência dos caracteres florais, de mutualistas e antagonistas sobre o êxito reprodutivo feminino de *Tocoyena formosa*

Para determinar a influência simultânea dos caracteres florais e dos distintos interagentes (polinizadores, predadores de sementes pré-dispersão e formigas) sobre o ERF de *T. formosa* utilizamos análise de caminhos (*path analysis*) e modelagens de equações estruturais (SEM) (Mitchell 1992). Essa abordagem permite testar as relações entre os caracteres florais, os interagentes e as medidas de êxito reprodutivo através de uma única hipótese causal sobre o sistema, assim como quantificar os efeitos diretos e indiretos de cada variável (Kingsolver & Schemske 1991). Para isso, construímos três modelos, representados através de diagramas de caminho, que correspondem às hipóteses *a priori* sobre as possíveis relações entre as variáveis. Os modelos compartilham uma estrutura central que representa a relação entre os caracteres florais (comprimento do tubo da corola e número total de flores da planta) e quatro medidas de ERF: i) proporção de frutos iniciados (razão entre o número de frutos iniciados e o número total de flores do ramo); ii) número total de frutos iniciados por planta (estimado através do número total de flores da planta pela proporção de frutos iniciados); iii) número médio de sementes por fruto (estimado em 3 a 5 frutos por planta); e iv) o número total de sementes por planta (estimado através do número total de frutos desenvolvidos pelo número médio de sementes por fruto). Também incluímos uma via que

testa a covariância entre o número de flores e comprimento do tubo floral. O número total de flores possui um efeito direto sobre o número total de frutos iniciados ao aumentar o número absoluto de ovários disponíveis. Por outro lado, o número de flores e o comprimento do tubo da corola também possuem um efeito sobre a atratividade (efeito do display floral) e o ajuste morfológico com os visitantes florais, logo, ambos podem ter um efeito indireto sobre a formação de frutos e sementes. Finalmente o número total de sementes na planta depende do número de frutos formados e do número de sementes por fruto.

Entre os modelos testados, o A representa o modelo global no qual, ademais da estrutura central, incluímos vias envolvendo as formigas e antagonistas, cuja interação deve influenciar o êxito reprodutivo final, i.e. número total de sementes produzidas. O resultado do levantamento da fauna de predadores de sementes sugere que curculionídeos são os principais predadores de sementes pré-dispersão (veja também Cap. I), logo, o número médio de sementes por fruto deve depender principalmente da frequência de curculionídeos. A frequência desses predadores pode ser afetada pela presença de formigas defensivas (i.e. abundância das formigas relativa ao número de flores do ramo), que por sua vez pode depender do número de nectários pericárpicos ativos, i.e. número de frutos iniciados. Adicionalmente, a abundância de frutos iniciados na planta também pode influenciar a frequência dos predadores, através da atratividade desses insetos. Neste sentido, além da via que relaciona os caracteres florais às medidas finais de ERF, o modelo também considera o efeito dos caracteres florais através de vias envolvendo as formigas e os predadores de sementes. Já no modelo B o efeito das formigas sobre os predadores foi considerado nulo. Incluímos esse modelo, pois o efeito defensivo de formigas associadas aos nectários extraflorais pode ser muito variável (Heil & McKey 2003, Rosumek et al. 2009, veja cap. I). Por último, no modelo C, consideramos que os predadores de sementes não influenciam o número de sementes por fruto, considerando que o ERF final depende principalmente da interação com os polinizadores.

Em seguida, testamos estatisticamente qual dos três modelos hipotéticos melhor se ajusta aos dados observados através de SEM e dos índices de ajuste (χ^2 , CFI, RMSEA e AIC). O número total de flores, número de frutos iniciados e número total de sementes foram log transformados. Modelos com valores não significativos de χ^2 são considerados bons descritores dos dados observados (Mitchell 1992). O índice de ajuste comparativo (CFI) leva em consideração a complexidade do modelo, evitando a subestimação em amostras pequenas, valores próximos a um indicam excelente ajuste. A raiz da média dos quadrados dos erros de aproximação (RMSEA) representa o quão bem o modelo se ajusta, não somente à amostra utilizada, mas também à população, valores inferiores a 0,08 são considerados adequados,

abaixo de 0,06 indicam um ajuste razoável e valores abaixo de 0,05 são considerados ótimos (MacCallum et al. 1996). Para comparações entre os modelos utilizamos o Critério de Informação de Akaike (AIC). Modelos com menor valor de AIC apresentam melhor ajuste aos dados observados. Adicionalmente, utilizamos os resultados dos experimentos de exclusão de predadores e de formigas para corroborar a escolha do modelo.

O efeito dos polinizadores foi avaliado indiretamente (i.e. através da relação entre os caracteres florais e os frutos iniciados) e não através de uma medida direta de sua atividade (Wootton 1993), o que impossibilita testar um modelo sem polinizadores. Além do que, a espécie apresenta autoincompatibilidade esporofítica e, portanto, não forma frutos na ausência de polinizadores. Neste sentido, para determinar influência dos polinizadores sobre a formação de frutos e sementes, realizamos uma análise multigrupo (*Multigroup Analysis*) que permite testar se determinados parâmetros do modelo diferem entre distintos grupos de dados (veja referências em Rey et al. 2006). Neste caso, testamos o modelo obtido na análise anterior em condições naturais de polinização e suplementação manual de pólen em três cenários possíveis que diferem quanto à restrição imposta no valor dos coeficientes das vias. Primeiro testamos a hipótese mais restritiva, i.e. não existem diferenças nas relações entre as variáveis entre os tratamentos. Para isso, construímos um modelo no qual foram impostas restrições em todos os coeficientes das vias (modelo invariável). Posteriormente, testamos a hipótese menos restritiva, na qual as vias do modelo podem apresentar valores distintos segundo o tratamento (modelo variável). Finalmente, testamos um modelo no que somente os coeficientes das vias sob o efeito dos polinizadores (i.e. vias que ligam os caracteres florais a proporção de frutos iniciados e número total de frutos iniciados) variavam entre os tratamentos, sendo que as demais permaneciam invariáveis (modelo parcial). Testamos estatisticamente o grau de ajuste dos modelos através da análise de significância de χ^2 e dos índices AIC e BIC. Caso polinizadores influenciem na relação entre os caracteres florais e o ERF, esperamos que o valor dos coeficientes das vias relacionadas ao efeito dos polinizadores seja variável entre os tratamentos.

Análises de seleção fenotípica

Para testar se a morfologia floral de *T. formosa* está sujeita a seleção fenotípica mediada por polinizadores, assim como, para testar o efeito de predadores de sementes e formigas sobre a forma e a intensidade da seleção imposta pelos polinizadores, nós estimamos os gradientes de seleção natural (direcional, estabilizadora e disruptiva) nos experimentos de exclusão para cada uma das medidas de êxito reprodutivo adotadas (proporção de frutos iniciados, número total de frutos iniciados, número de sementes por fruto e número total de

sementes por planta). As análises de seleção fenotípica foram conduzidas utilizando-se os valores de *fitness* relativo, os quais foram calculados dividindo-se o valor do *fitness* individual de cada planta pela média da população. Para estas análises os valores de ERF foram utilizados como variável resposta, enquanto a medida do caractere morfológico foi utilizada como variável preditora. Para estimar a forma e a intensidade da seleção natural agindo sobre os caracteres florais foram utilizados modelos aditivos generalizados (GAM), segundo a metodologia proposta por Morrissey & Sakrejda (2013). Gradientes de seleção lineares significativos (β) indicam que a seleção estará agindo na direção de caracteres morfológicos com valores mais elevados ($\beta > 0$, e.g. corolas mais longas) ou mais baixos ($\beta < 0$, e.g. corolas mais curtas), induzindo mudanças nas médias das populações (seleção direcional positiva ou negativa). Gradientes de seleção não lineares significativos (γ) podem indicar curvas de seleção não lineares côncavas, ou seja, seleção estabilizadora ($\gamma < 0$), na qual a seleção age a favor da média da população e contra fenótipos extremos. Já curvas convexas indicam seleção agindo contra a média da população e a favor dos fenótipos extremos, ou seja, seleção disruptiva, ou então, seleção correlacional em uma dada combinação de caracteres ($\gamma > 0$). Para visualizar a relação entre o êxito reprodutivo e o caractere floral utilizamos a técnica de *Splines* cúbico (*cubic splines*) que consiste em um método de regressão não paramétrica que evita suposições *a priori* sobre a forma da relação entre o *fitness* e o caractere fenotípico (Schluter 1988). Utilizamos o pacote *gsg* (Morrissey & Sakrejda 2013) para estimar os gradientes de seleção fenotípica e o pacote *mgcv* (Wood 2006) para estimar as regressões *Splines* cúbicas. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o Software R ver. 3.2.1 (<www.r-project.org>).

A seleção imposta por polinizadores foi estimada através da influência do comprimento do tubo floral sobre a proporção de frutos iniciados e sobre o número total de frutos iniciados nos dois tratamentos de polinização natural. Para determinar se polinizadores são os agentes da seleção observada sobre o caractere floral, comparamos o gradiente de seleção estimado em ramos expostos a polinização natural com ramos que receberam suplementação manual de pólen e foram isolados dos polinizadores (Fishman & Willis 2008, Sletvold et al. 2010). Para quantificar a força da seleção imposta pelos polinizadores, subtraímos o gradiente de seleção estimado para o tratamento de suplementação de pólen na ausência de polinizadores do gradiente obtido no tratamento controle (conforme Sletvold et al. 2010).

Para determinar se predadores de sementes influenciam a seleção fenotípica, estimamos os gradientes de seleção através da influência do caractere floral sobre o número médio de sementes por fruto nos tratamentos expostos aos predadores na presença e ausência

de formigas, e no tratamento de exclusão de predadores. O resultado final da seleção natural atuando sobre o comprimento do tubo floral foi estimado através do número total de sementes por planta (i.e. número total de frutos desenvolvidos na planta multiplicado pelo número médio de sementes por fruto), uma vez que essa medida inclui o efeito simultâneo dos polinizadores e predadores de sementes.

RESULTADOS

Polinizadores

Três espécies de esfingídeos de probóscide longa foram observadas como polinizadores de *T. formosa* durante o período de estudo. Foram elas *Neococcytius cluentius* (Cramer, 1775), com $19,78 \pm 1,37$ cm de probóscide, *Agrius cingulata* (Fabricius, 1775) com $9,57 \pm 0,82$ cm e *Manduca rustica* (Fabricius, 1775) com $13,29 \pm 1,02$ cm (Fig. 1A, B e C). Em todos os casos observamos que o pólen de *T. formosa* é exportado em massas que formam uma unidade discreta aderida a probóscide do polinizador (Fig. 1A e B). Adicionalmente, simulamos a inserção da probóscide no tubo da corola com uma agulha com 15 cm de comprimento (modelo Hamilton 22 SGA RN 6PK 150mm PT3), e evidenciamos que o pólen adere-se à probóscide formando em uma massa discreta, cuja posição corresponde ao comprimento do tubo floral (veja detalhes na Fig. 1A e B). Também observamos a deposição da massa de pólen sobre a superfície do estigma da flor após a primeira visita de uma flor na fase feminina (Fig. 1D). A frequência das visitas foi de 1,32 e 4,75 visitas por hora em 2014 e 2015, respectivamente. Cada visita durava entre cinco e 70 segundos, e o número mínimo de flores acessadas variou entre uma e oito.

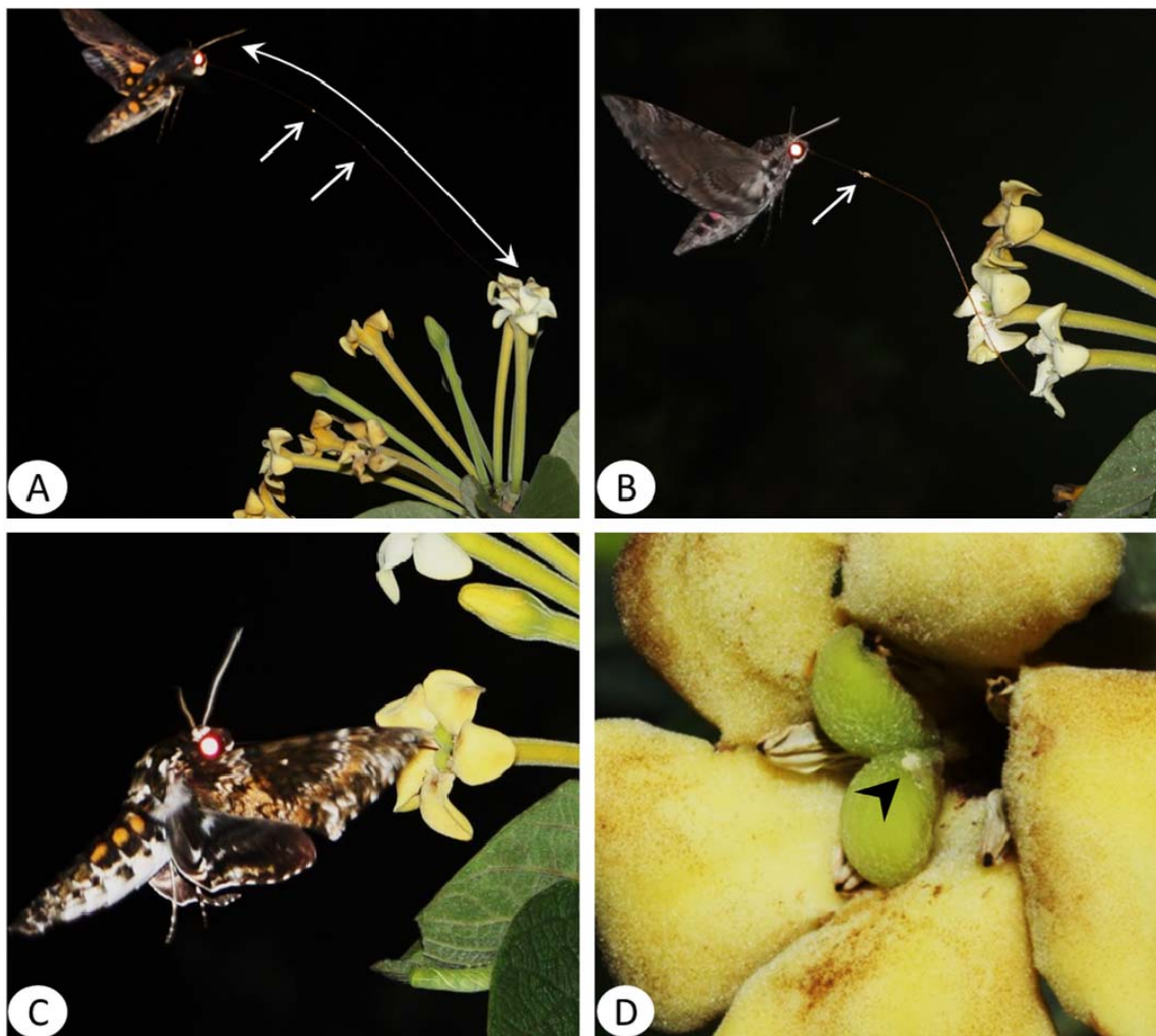


Figura 1. Principais visitantes florais de *Tocoyena formosa*. **(A)** *Neococytius cluentius*. Note a longa probóscide com 22 cm de comprimento carregando duas massas de pólen (setas); **(B)** *Agrius cingulata* com cerca de 10 cm de comprimento de probóscide com uma massa de pólen (seta); **(C)** *Manduca rustica* com sua probóscide de cerca de 13 cm inserida no tubo da corola; **(D)** Massa de grãos de pólen (cabeça de seta) depositada sobre a superfície estigmática da flor logo após a visita de *M. rustica* registrada em C.

Predadores de sementes e formigas associadas aos nectários pós-florais

Observamos a presença de predadores de sementes pré-dispersão nos frutos (N=245) de 88% (N=37) das plantas analisadas. Os principais predadores encontrados pertencem às ordens Hymenoptera (48,2%), Coleoptera (43,3%), Diptera (7,5%) e Lepidoptera (0,97%). Entretanto, os coleópteros foram os predados de sementes mais frequentes, pois estavam presentes em 69 % das plantas, enquanto os himenópteros em 48%, seguidos por Diptera em 29% e Lepidoptera em apenas 7% das plantas analisadas. O besouro da família Curculionidae *Hemicolpus abdominalis* (Hustache,1938) representou 97% (N=129 indivíduos) dos Coleoptera encontrados nas sementes de *T. formosa*. Os únicos representantes de Hymenoptera foram microvespas possivelmente pertencentes à família Ichneumonidae (N=148 indivíduos).

Entre as formigas associadas aos nectários pós-florais, nós registradas pelo menos 10 espécies distribuídas em sete gêneros (*Ectatomma*, *Brachymyrmex* cf., *Camponotus*, *Cephalotes*, *Crematogaster*, *Neoponera*, *Pseudomyrmex*) e cinco subfamílias (Ectatomminae, Formicinae, Myrmicinae, Ponerinae, Pseudomyrmecinae). As espécies mais abundantes pertenciam aos gêneros *Ectatomma* e *Camponotus* (N=225 e 223 indivíduos, respectivamente). *Ectatomma tuberculatum* (Olivier, 1792) foi encontrada em 60% (N=25) das plantas estudadas, ao passo que *Camponotus crassus* (Mayr, 1862) estava presente em apenas 19% (N=8) das plantas.

Efeito dos interagentes sobre a reprodução de *T. formosa*

A proporção de frutos iniciados foi maior no tratamento de suplementação manual de pólen ($0,55 \pm 0,13$) do que no tratamento controle ($0,47 \pm 0,16$; $t = -2,80$, $P = 0,008$, $N = 42$), porém o número médio de sementes por fruto não apresentou diferenças entre ambos os tratamentos (suplementação de pólen = 40 ± 15 ; controle = 40 ± 14 ; $t = 0,315$, $P = 0,412$, $N = 42$; Tabela 3 material suplementar). A eficácia reprodutiva da população foi de 0,86 e o índice de limitação polínica de 0,14 na estação reprodutiva de 2015. A presença de predadores de sementes teve um efeito negativo sobre o número de sementes por fruto ($t = 19,15$, d.f. = 117, $P < 0,01$, $N = 42$ plantas, Fig. 2). O número de sementes e de predadores de sementes dos frutos provenientes dos tratamentos com e sem formigas não diferiu entre si (Tabela 1), o que sugere que as formigas não foram efetivas na proteção dos frutos contra os predadores de sementes (Tabela 1, Fig. 2).

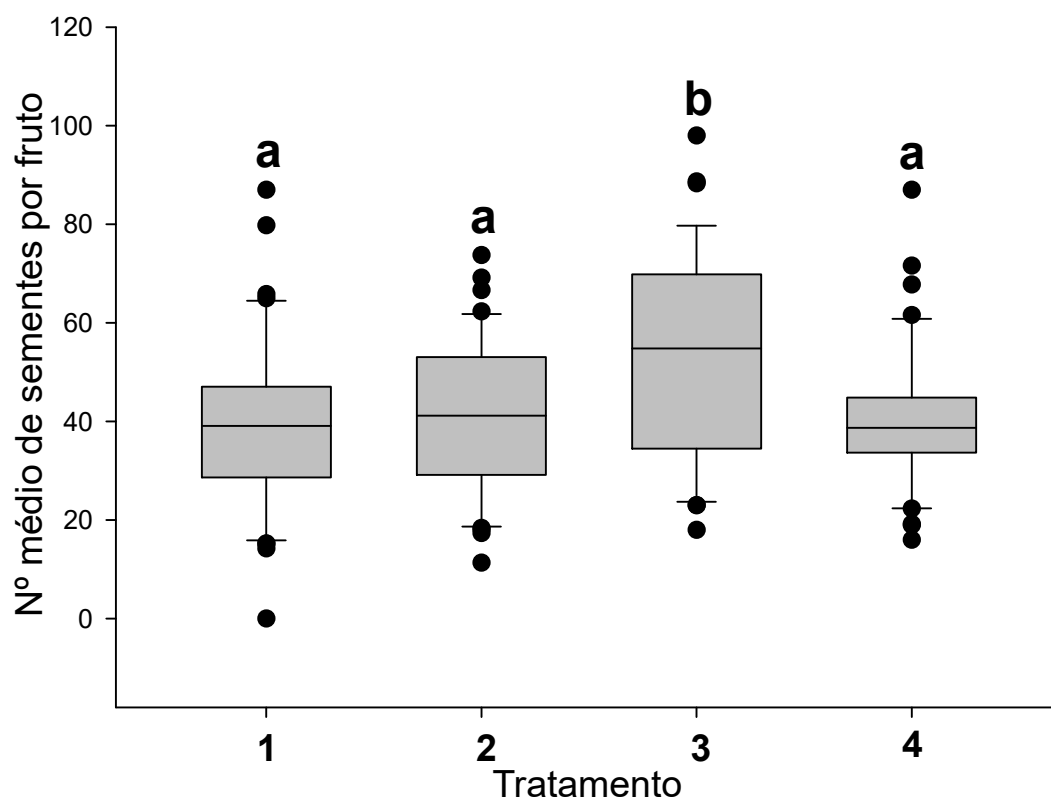


Figura 2. Efeito dos tratamentos sobre o número de sementes produzidas por fruto (N=42 plantas). **(1)** - formação de sementes sob condições naturais de polinização, frutos expostos aos predadores e isolados de formigas; **(2)** - condições naturais de polinização e suplementação manual de pólen, frutos expostos aos predadores e formigas; **(3)** - suplementação manual de pólen e frutos isolados dos predadores de sementes; **(4)** - condições naturais de polinização, livre acesso de predadores e formigas. Letras diferentes indicam diferenças significativas no número de sementes por fruto ($t=19,15$, $d.f.=117$, $P < 0,001$, $N=42$ plantas).

Tabela 1. Resultados do experimento de exclusão. Efeito da presença de formigas sobre o número de besouros Curculionidae por fruto e o número sementes por fruto (N=42 plantas).

	Tratamento		Test <i>t</i> de Student pareado	Valor de P
	Com formigas	Sem formigas		
Curculionídeos / fruto	0,57 ± 0,62	0,62 ± 0,57	-0,487	0,629
Sementes / fruto	40,26 ± 14,29	39,51 ± 17,63	0,258	0,798

Influência dos caracteres florais, mutualistas e antagonistas sobre a reprodução *T. formosa*

Os resultados de SEM indicaram que os três modelos hipotéticos apresentaram bom ajuste global aos dados observados (Tabela 2, Fig. 3). Dentre os modelos testados, o A e o C apresentaram o pior e o melhor ajuste, respectivamente (Tabela 2, Fig. 3A e C). O modelo B (Fig. 3B) foi o que melhor descreveu a relação entre as variáveis, uma vez que os experimentos de exclusão demonstraram que os predadores de sementes levaram a redução no número de sementes por fruto e que formigas não foram efetivas. Esses resultados juntamente com o valor de RMSEA (i.e. valor inferior a 0,05) respaldaram a inclusão de predadores e a remoção de formigas do modelo (Tabela 2). O resultado da análise de caminhos mostrou que o número total de flores não influenciou na proporção de frutos iniciados, embora tenha apresentado um efeito direto positivo sobre o número total de frutos iniciados ($0,924 + (-0,213 \times 0,534) = 0,810$; Fig. 3 B). Isso indica que o efeito total do número de flores sobre o número total de sementes produzidas na planta (efeito total = $(0,924 \times 0,804) + (-0,213 \times 0,534 \times 0,804) = 0,651$) deve-se principalmente, ao efeito direto dessa variável sobre o número de frutos e não ao efeito indireto mediado por polinizadores. Por outro lado, observamos uma relação positiva entre o comprimento do tubo da corola e a proporção de frutos iniciados ($0,352$) e o número total de sementes ($0,352 \times 0,534 \times 0,804 = 0,151$). Não observamos correlação entre o número de flores e o comprimento do tubo da corola. O modelo B evidenciou a existência de relação entre o número de predadores de sementes e a redução do número de sementes por fruto, indicando um efeito total negativo dos curculionídeos sobre o êxito reprodutivo feminino (efeito total = $-0,387 \times 0,411 = -0,159$; Fig. 3B). Entretanto, não observamos influência do número de frutos iniciados sobre o número de predadores por fruto. O que sugere que os caracteres florais não possuem um efeito indireto sobre o ERF através da via que envolve os predadores de sementes.

O efeito do comprimento do tubo floral sobre o êxito reprodutivo feminino foi mediado pela interação com polinizadores, uma vez que o resultado da análise multigrupo indicou melhor ajuste dos modelos variável e parcial, nos quais os coeficientes das vias são variáveis entre os dois tratamentos de polinização (Tabela 3). Dentre estes modelos, o modelo parcial apresentou melhor ajuste (Tabela 3). Tal modelo evidenciou que os coeficientes das vias que ligam o comprimento do tubo floral e as medidas iniciais de êxito reprodutivo (proporção de frutos iniciados e número total de frutos iniciados) foram significativos somente no tratamento de polinização natural (Fig. 4A). Finalmente, esses resultados demonstraram que os fatores que melhor explicam o ERF em *T. formosa* estão relacionados ao efeito direto do número de flores e indireto do comprimento do tubo floral sobre a formação dos frutos.

Tabela 2. Comparação entre os modelos causais alternativos mediante SEM e respectivos índices de ajuste.

Modelo	χ^2	d.f.	P	CFI	AIC	RMSEA
A	20,882	17	0,232	0,988	661,446	0,074
B	12,180	12	0,431	0,999	537,537	0,019
C	12,339	09	0,195	0,989	420,629	0,094

Tabela 3. Resultado da análise multigrupo. Comparação dos modelos hipotéticos entre os tratamentos de suplementação manual de pólen e polinização natural.

Modelo	χ^2	d.f.	AIC	BIC
Modelo invariável	79,68	32	1092,1	1184,5
Modelo variável	34,18	24	1062,6	1174,4
Modelo parcial	45,10	29	1063,5	1163,2

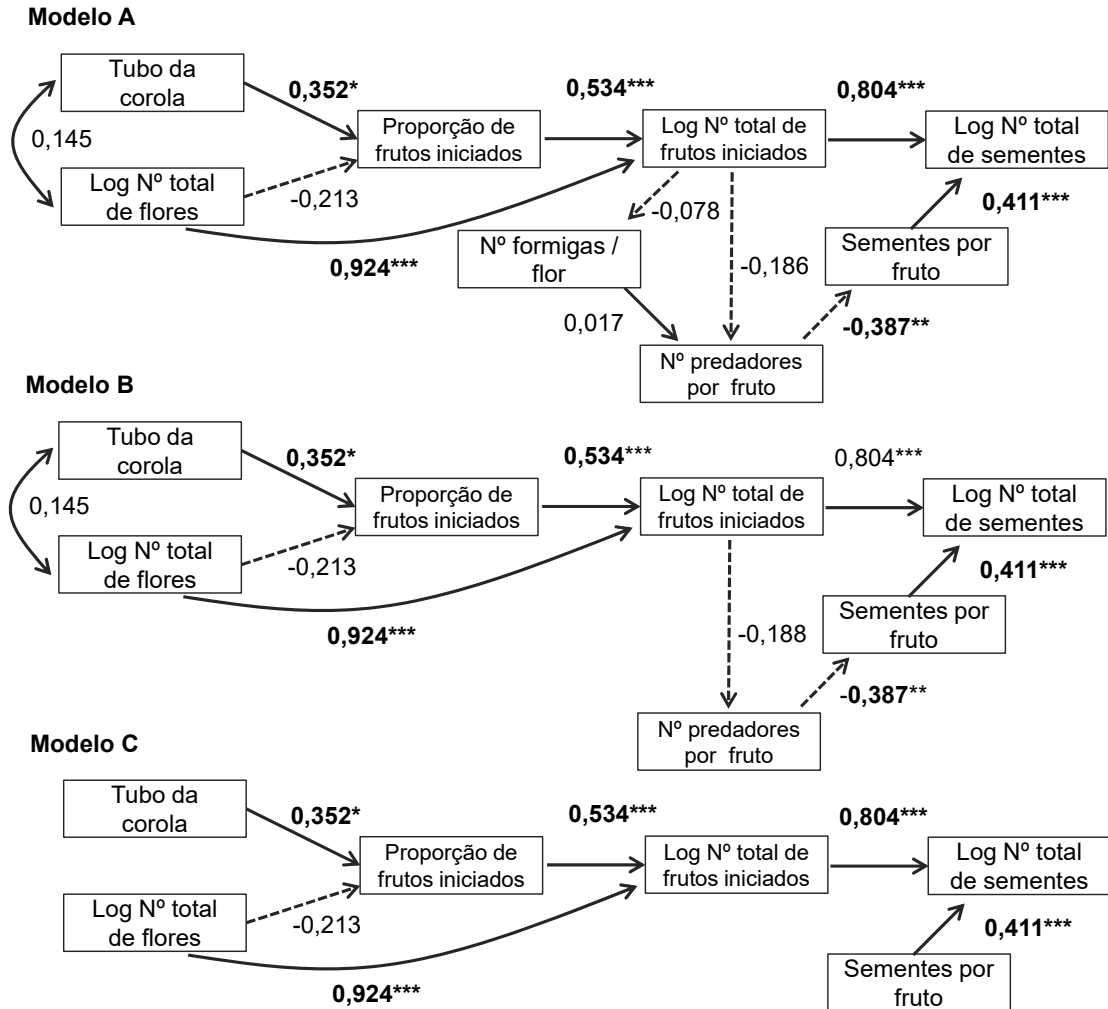


Figura 3. Modelos hipotéticos sobre a relação entre os caracteres florais, os distintos interagentes e medidas de êxito reprodutivo feminino. O modelo A representa o modelo global, no qual formigas afetam os predadores de sementes pré-dispersão, que por sua vez possuem um efeito sobre o fitness final da planta. No modelo B formigas não influenciam o número de predadores de sementes por fruto e em C predadores de sementes não afetam o número de sementes por frutos. Setas com uma única ponta indicam a relação de causa e efeito entre duas variáveis. Setas com duas pontas representam a correlação ou covariância entre um par de variáveis. Linhas sólidas indicam coeficientes positivos e linhas pontilhadas coeficientes negativos. Os valores indicam os coeficientes de regressão de cada via, e os asteriscos representam nível de significância dos coeficientes (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$).

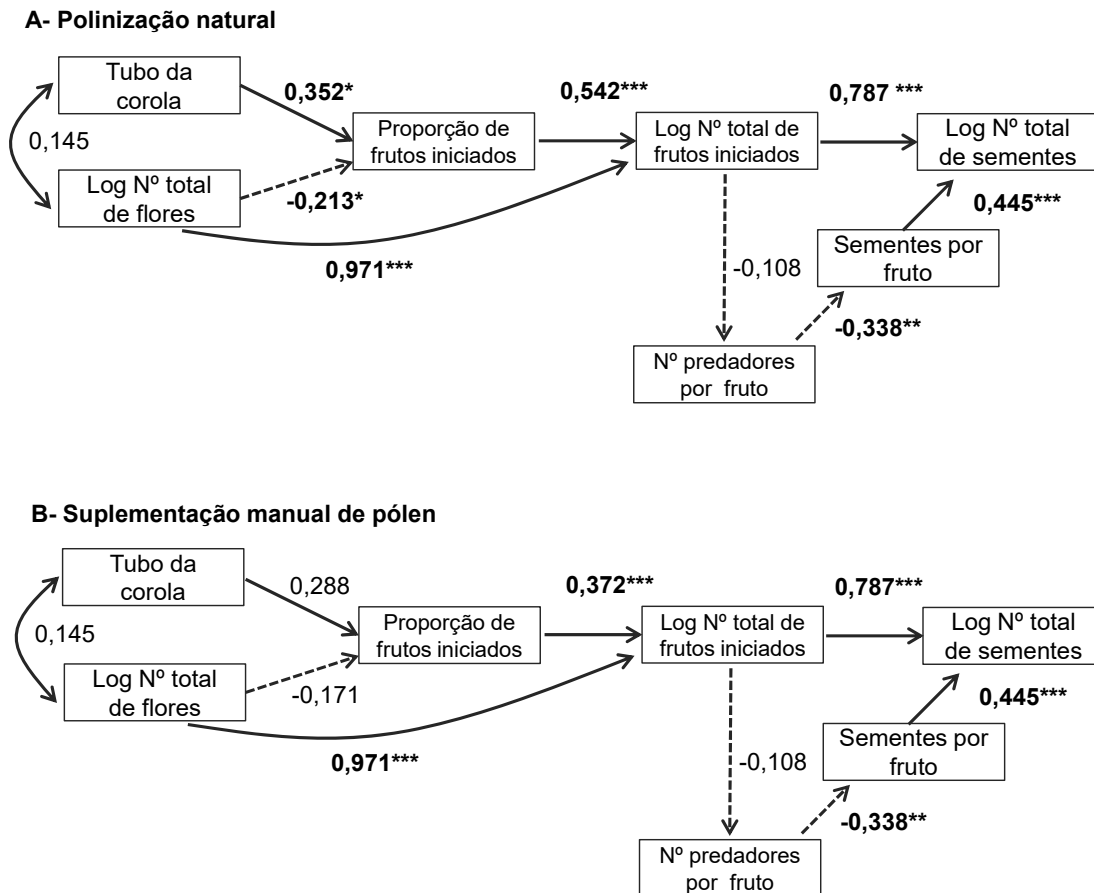


Figura 4. Análise multigrupo. Modelo de melhor ajuste (i.e. modelo parcial) ajustado aos dois tratamentos de polinização; **(A)** indica que o modelo foi ajustado aos dados obtidos no tratamento de polinização sob condições naturais e **(B)** no tratamento de suplementação manual de pólen. Os coeficientes das vias associadas ao efeito dos polinizadores (vias relacionam os caracteres florais e as duas medidas iniciais de *fitness*) possuem valores diferentes segundo o tratamento de polinização. Linhas sólidas indicam coeficientes positivos e linhas pontilhadas coeficientes negativos. Os valores indicam os coeficientes de regressão de cada via, e os asteriscos representam o nível de significância do coeficiente (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$).

Seleção fenotípica

Observamos gradientes de seleção positivos e significativos para as duas medidas de êxito reprodutivo utilizadas, i.e. proporção de frutos iniciados e número total de frutos iniciados, em ambos os tratamentos que envolveram polinização natural (Tabela 4). O que indica a ocorrência de seleção direcional positiva sobre o comprimento do tubo floral (Fig. 5A). Já o tratamento de suplementação manual de pólen em flores isoladas com sacos de organza apresentou gradientes de seleção não significativos e muito próximos de zero (Tabela 4). A força da seleção imposta pelos polinizadores foi maior através do número total de frutos iniciados ($0,114 - (-0,013) = 0,127$) do que através da proporção de frutos iniciados por planta ($0,086 - (-0,007) = 0,093$). Os gradientes de seleção em conjunto com as regressões *Spline* cúbicas evidenciaram que polinizadores foram os agentes da seleção direcional positiva observada sobre o comprimento do tubo floral (Tabela 4; Fig. 5A). Os gradientes de seleção estimados através do número médio de sementes por frutos não foram significativos, indicando que a atividade dos predadores de sementes não exerceu nenhuma pressão seletiva sobre a morfologia floral (Tabela 4). A seleção estimada através da influência do comprimento do tubo da corola sobre o número total de sementes produzidas na planta foi direcional positiva no tratamento controle (polinização natural) e negativa no tratamento de suplementação manual de pólen (Tabela 4, Fig. 5B). Predadores de sementes pré-dispersão não influenciaram na seleção imposta pelos polinizadores sobre a morfologia floral, uma vez que o valor dos coeficientes de seleção obtido através do número total de sementes produzidas foi positivo e, inclusive, maior que aqueles observados tanto para a proporção, quanto para o número inicial de frutos formados (Tabela 4). Neste sentido, a seleção direcional positiva imposta pelos polinizadores sobre o comprimento do tubo continua consistente quando estimada através de medidas finais do *fitness* (i.e. número total de sementes produzidas na planta).

Tabela 4. Gradientes de Seleção fenotípica para o comprimento do tubo da corola para cada componente do êxito reprodutivo feminino por tratamento em 42 plantas. 1 – polinização natural, livre acesso de predadores e exclusão de formigas; 2 – Suplementação de pólen em flores abertas a visitação, livre acesso d predadores e formigas; 3 – Suplementação de pólen em flores isoladas dos polinizadores, exclusão de predadores e formigas; 4 – Controle, condições naturais.

Medida de <i>fitness</i>	Tratamento				
	1	2	3	4	
Proporção de frutos iniciados	β_i (EE)	0,103 (0,05)*	0,095 (0,045)	-0,007 (0,065)	0,086 (0,047)
	γ_{ii} (EE)	0,026 (0,080)	-0,002 (0,002)	-0,077(0,083)*	0,065 (0,055)
N° total de frutos iniciados	β_i (EE)	0,158 (0,072)*	0,074 (0,044)	-0,013 (0,078)	0,114 (0,056)*
	γ_{ii} (EE)	0,025 (0,024)*	0,006 (0,007)	-0,153 (0,112)	0,079 (0,067)
N° de sementes por fruto	β_i (EE)	-0,008 (0,070)	0,017 (0,061)	-0,113 (0,062)	0,076 (0,057)
	γ_{ii} (EE)	0,137 (0,097)	$1,52e^{-4}$ ($9,67e^{-5}$)	-0,049 (0,063)	0,093 (0,080)
N° total de sementes	β_i (EE)	0,116 (0,137)	0,027 (0,076)	-0,231(0,105)*	0,194 (0,114)
	γ_{ii} (EE)	0,146 (0,179)	0,001 (0,009)	-0,182 (0,165)	0,304(0,212)*

Gradientes de seleção linear (β_i), gradientes de seleção não lineares (γ_{ii}) e erro estandar (EE). *Indica gradiente de seleção significativo, *P < 0,05.

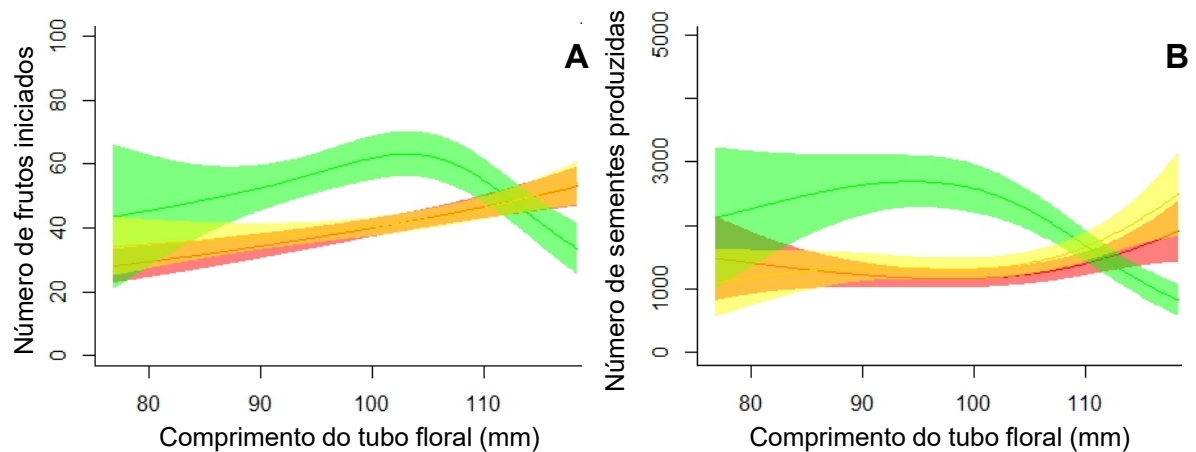


Figura 5. Regressões spline cúbicas entre o comprimento do tubo da corola e o êxito reprodutivo feminino. A curva em vermelho indica a presença de formigas no tratamento com polinização natural e livre acesso de predadores, e a curva em amarelo indica o mesmo tratamento na ausência de formigas; já a curva em verde designa o tratamento de polinização manual na ausência de predadores de sementes. **(A)** Relação entre o comprimento do tubo floral e o número total de frutos iniciados, evidenciando seleção direcional positiva imposta pelos polinizadores (curvas em vermelho e amarelo) e seleção direcional negativa no tratamento de polinização manual (curva em verde); **(B)** Relação entre o comprimento do tubo floral e o número total de sementes, evidenciando a seleção direcional positiva sobre a morfologia floral na presença de polinizadores (linhas em vermelho e amarelo) e seleção direcional negativa no tratamento de suplementação de pólen na ausência de polinizadores (linha verde).

DISCUSSÃO

A hipótese proposta para testar a influência simultânea da morfologia floral, dos mutualistas e antagonistas sobre o *fitness* da planta apoia que polinizadores e predadores de sementes pré-dispersão afetam diretamente a reprodução das plantas através do componente materno do *fitness*. Entretanto, também indica que a morfologia floral, em particular o comprimento do tubo da corola, possui um efeito importante sobre o êxito reprodutivo feminino (ERF) devido à influência dos polinizadores sobre a formação de frutos. Embora, predadores de sementes pré-dispersão tenham tido um efeito negativo sobre a produção de sementes, eles não interferiram na seleção imposta pelos polinizadores sobre o comprimento do tubo floral. Assim, os polinizadores são os principais agentes seletivos da morfologia floral em *Tocoyena formosa*.

Em comunidades tropicais, mariposas da família Sphingidae representam um importante grupo de polinizadores (Haber & Frankie 1989, Oliveira et al. 2004). Porém, as espécies com longos aparelhos bucais compreendem apenas uma pequena fração de tais comunidades (Haber & Frankie 1989, Agosta & Janzen 2005, Amorim et al. 2014). No cerrado, a fauna de esfingídeos apresenta uma composição similar àquela registrada para outras comunidades tropicais e aproximadamente 20% das espécies possuem probóscides maiores que 60 mm (Amorim et al. 2009). Adicionalmente, em outras comunidades no Brasil, esse grupo de mariposas com probóscide longa apresenta uma baixa frequência de visitas em espécies esfingófilas especializadas (Oliveira et al. 2004, Amorim et al. 2014). Entretanto, a elevada eficácia reprodutiva observada na população estudada reflete uma elevada frequência de visitas, sendo a eficácia duas vezes superior ao valor reportado para outra população de *T. formosa* no Brasil central (veja Oliveira & Gibbs 2000). Por outro lado, a menor frequência de visitas observada na estação reprodutiva anterior corrobora a noção de que a fauna de esfingídeos pode sofrer flutuações temporais (Haber & Frankie 1989, Amorim et al. 2009, Moré et al. 2012).

De forma geral, plantas autoincompatíveis apresentam baixa taxa de frutificação e elevada limitação polínica (Larson & Barrett 2000, Knigh et al. 2005). Porém, apesar da suplementação manual de pólen ter incrementado a produção de frutos em relação polinização natural, a diferença na proporção de frutos iniciados é baixa, o que confirma a elevada efetividade da polinização natural durante a estação reprodutiva estudada. De fato, o valor de ILP obtido é inferior ao observado por Larson & Barrett (2000) para plantas com sistemas especializados de polinização ($0,42 \pm 0,03$, N=94 espécies), bem como, para espécies autoincompatíveis ($0,59 \pm 0,04$, N=66 espécies) indicando ausência de limitação em *T. formosa* durante o período de estudos. De forma similar, a ausência de diferença no número médio de

sementes por frutos entre o controle e o tratamento de suplementação de pólen, também indica ausência de limitação polínica através do número de sementes, reforçando o fato de que os polinizadores foram muito efetivos na polinização de *T. formosa*.

Espécies de esfingídeos com probóscide longa podem acessar o néctar da maioria das espécies esfingófilas de determinada comunidade, logo, podem ser mais generalistas quanto aos hábitos alimentares do que mariposas com probóscides mais curtas (Haber & Frankie 1989, Martins & Johnson 2013). Entretanto, essas mariposas têm acesso exclusivo ao maior volume de néctar disponível em flores de tubos mais longos (Martins & Johnson 2013), livrando-se da competição com mariposas de probóscides curtas (Rodríguez-Gironés & Santamaría 2007). No presente sistema o singular registro de *Neococytius cluentius*, uma das espécies de esfingídeos com maior comprimento de probóscide no mundo (> 20 cm), reforça a ideia de que plantas com tubos longos representam uma fonte importante de recursos energéticos para esfingídeos com probóscide longa, cujo elevado tamanho corporal está diretamente associado a uma maior demanda energética. Por sua vez, as espécies esfingófilas com tubo floral longo, como é o caso de *T. formosa*, beneficiam-se da maior fidelidade dessas mariposas (Rodríguez-Gironés & Santamaría 2007). Assim, espécies esfingófilas com tubo floral longo, especializaram-se em um nicho específico de polinizadores, o que garante maior efetividade do serviço de polinização (Johnson & Raguso 2015). Neste contexto, a elevada frequência de visitas em conjunto com uma alta eficiência na transferência de pólen por mariposas com probóscide longa responde pela elevada efetividade do serviço de polinização que observamos em *T. formosa*.

Os resultados da análise de caminhos em conjunto com modelagem de equações estruturais e análise multigrupo demonstram que o comprimento do tubo floral influencia de forma positiva o efeito dos polinizadores sobre o êxito reprodutivo feminino. Por outro lado, o efeito positivo do número de flores sobre o ERF deve-se a influência direta dessa variável sobre o número de frutos iniciados. Embora, o número de flores também possa influenciar de forma indireta o ERF através do seu efeito sobre a atratividade dos polinizadores, nós notamos que o efeito dos polinizadores sobre a proporção de frutificação foi independente do efeito do display floral. Adicionalmente, a falta de efeito correlacional entre o número de flores e o comprimento do tubo floral destaca a importância do comprimento do tubo da corola para a taxa de frutificação. Esses resultados juntamente com a elevada diferença observada nos gradientes de seleção fenotípica em condições naturais de polinização e após a suplementação de pólen corroboram a hipótese de que polinizadores são os principais agentes da seleção observada sobre o comprimento do tubo floral em *T. formosa*. Neste sentido, a suplementação manual de pólen ao diminuir a variância na proporção de frutos iniciados entre

as plantas tira o efeito da morfologia floral sobre o êxito reprodutivo. Isso evidencia que em flores expostas à polinização natural, a influência do comprimento do tubo sobre o ERF ocorre devido a formação diferencial de frutos em plantas com flores cujo tubo é mais longo.

Ainda que, de forma geral, a oportunidade de seleção fenotípica pareça estar associada a uma maior limitação polínica (Johnson & Steiner 1997, Ashman & Morgan 2004, Sletvold et al. 2010), observamos a ocorrência de seleção mesmo na ausência de tal limitação. Nossos resultados indicam que a seleção mediada por polinizadores nem sempre está relacionada à limitação polínica (veja também Parachnowitsch & Kessler 2010, Sletvold & Agren 2014). Estudos prévios têm demonstrado que as variações no comprimento do tubo floral levam a deposição diferencial de pólen no estigma das flores resultando em variações no êxito reprodutivo feminino (e.g. Nilsson 1988, Alexandersson & Johnson 2002, Pauw et al. 2009). Em *T. formosa*, a ausência de diferença no número de sementes entre frutos formados em condições naturais de polinização e após a suplementação de pólen indica que as flores recebem quantidades suficientes de pólen para a fecundação de todos os óvulos. Isto sugere que a seleção imposta por polinizadores não ocorre através do número de sementes produzidas, mas sim através de variações na oportunidade de formação de frutos.

Apesar da importância dos polinizadores e da morfologia floral para a formação de frutos, o ERF de *T. formosa* também está sujeito ao efeito simultâneo de antagonistas e outros mutualistas, como formigas defensivas associadas aos nectários pericárpicos pós-florais. Entretanto, apesar da aparente agressividade e elevada frequência, as formigas associadas aos não foram efetivas na proteção dos frutos contra os predadores de sementes pré-dispersão. Diante disso, os frutos em desenvolvimento sofreram elevada taxa de predação de sementes. A relação negativa entre o número de curculionídeos encontrados dentro dos frutos e o número de sementes por fruto, evidenciada através da análise de caminhos, sugere que variações na produção de sementes estão estreitamente associadas à presença dos antagonistas. Embora estudos prévios tenham relatado uma relação positiva entre determinados caracteres florais e a magnitude do efeito dos antagonistas (Brody & Mitchell 1997, Ehrlén et al. 2002, Herrera et al. 2002, Cariveau et al. 2004, Sletvold et al. 2015), não encontramos evidências de que curculionídeos prefiram plantas com mais flores e frutos. Neste sentido, os gradientes de seleção não significativos e próximos a zero confirmam a ausência de relação entre a morfologia floral e o efeito dos predadores. A presença de formigas associadas aos nectários pós-florais também não influenciou o efeito dos antagonistas sobre a produção de sementes.

Mesmo que em outros sistemas antagonistas possam diminuir as oportunidades de seleção imposta por polinizadores (Herrera 1993, Herrera 2000, Gómez 2003, 2008), em *T.*

formosa o forte efeito positivo dos polinizadores sobre o ERF, evidenciado principalmente através a produção de frutos, sobrepujou o efeito negativo dos predadores. Assim, a elevada taxa de formação de frutos que observamos parece contribuir diretamente com o efeito dos caracteres florais sobre o ERF. Logo, a elevada frequência de visitas dos esfingídeos e a efetividade do serviço de polinização, compensaram os efeitos negativos dos predadores de sementes sobre a produção de sementes *T. formosa*. Esses resultados sugerem que espécies de esfingídeos com probóscide longa atuam como os principais e mais importantes agentes seletivos da morfologia floral em *T. formosa*. De forma similar, outros estudos também observaram maior importância dos polinizadores em relação aos antagonistas para a seleção fenotípica em caracteres florais (Sandring & Ågren 2009, Sletvold et al. 2010, Bartkowska & Johnson 2012). Em conjunto, nossos resultados destacam a importância de combinar análises de seleção fenotípica com manipulações experimentais, uma vez que a relação entre os caracteres florais e o *fitness* da planta podem ser resultados de variações em características intrínsecas das plantas, ou mesmo do efeito das condições abióticas e dos múltiplos agentes seletivos (e.g. Fishman & Willis 2008, Sletvold et al. 2015).

É amplamente conhecido que polinizadores com aparelho bucal longo podem exercer pressões seletivas sobre o comprimento do tubo floral (Maad 2000, Alexandersson & Johnson 2002, Anderson & Johnson 2008, Pauw et al. 2009, Moré et al. 2012). Nesses casos, a presença de tubos florais longos possibilita maior ajuste morfológico entre as partes reprodutivas da flor e o polinizador, garantindo assim maior eficiência na exportação e recepção da carga polínica (Nilsson 1988, Alexandersson & Johnson 2002, Pauw et al. 2009). Porém, em determinados sistemas o pólen é acumulado na probóscide do polinizador, sugerindo que a efetividade da polinização não depende de uma correspondência estreita entre o tamanho da probóscide e do tubo floral (Johnson & Steiner 1997, Ellis & Johnson 2010). Nesses sistemas, o número de entrecruzamentos possíveis entre os tubos florais de distintos tamanhos é mais importante do que o ajuste entre a probóscide e o tubo floral (e.g. Johnson & Steiner 1997). Em ambos os anos de estudo, o comprimento médio das probóscides das espécies de esfingídeos que visitaram *T. formosa* excede o comprimento médio do tubo floral na população. Neste contexto, a deposição de uma massa de pólen na probóscide dos esfingídeos em altura correspondente ao tamanho do tubo floral fornece evidências de que a transferência de pólen ocorre preferencialmente entre flores cujo tubo da corola é igual ou maior que o tubo da flor doadora. Assim, plantas que produzem flores mais longas atuam principalmente como receptoras de pólen em *T. formosa*, enquanto que aquelas que produzem flores com tubos curtos atuam preponderantemente como exportadoras de pólen (veja Fig. 6). Tal processo de transferência de pólen nos permite entender como os polinizadores

influenciam a morfologia floral da espécie, bem como, a ocorrência de seleção fenotípica mesmo na ausência de limitação polínica. Uma vez que a produção de frutos na espécie depende da habilidade da planta, favorecida pela morfologia floral, em receber pólen dos demais indivíduos da população, e não do efeito da morfologia floral sobre o comportamento dos polinizadores.

Experimentos de encurtamento de tubos florais realizados em orquídeas proporcionaram evidências de que tubos curtos atuam principalmente como exportadores de pólen, uma vez que o efeito negativo do encurtamento foi maior sobre o componente feminino e menor sobre o masculino (veja Nilsson 1988, Jonhson & Steiner 1997, Ellis & Johnson 2010). Além do efeito positivo através do ERF, mariposas com longas probóscides possivelmente também exerçam pressão seletiva em direção oposta através do componente masculino do êxito reprodutivo (e.g. Ellis & Johnson 2010). Embora maior parte dos trabalhos tenha registrado seleção sobre caracteres florais através do componente feminino do *fitness*, estudos que estimaram a seleção em ambos os componentes do *fitness* reportaram variações na magnitude e direção da seleção (Maad 2000, Maad & Alexandersson 2004, Benitez-Vieyra et al. 2006). Assim, o efeito líquido da seleção sobre o comprimento do tubo pode depender da direção e magnitude das pressões seletivas atuando sobre os dois componentes do êxito reprodutivo mutualmente (Campbell 1989, Ellis & Johnson 2010). Neste sentido, caso pressões seletivas opostas atuando através do componente masculino e feminino do *fitness* tenham impossibilitado mudanças na distribuição do comprimento do tubo na população ao longo das gerações (Campbell 1989), isso poderia explicar a distribuição normal dos tubos florais observada na população de estudo, bem como, em outras populações de *T. formosa* no Brasil (F.W. Amorim, dados não publicados). No caso daqueles indivíduos na população que produzem flores cujo comprimento do tubo floral está próximo da média, a recepção e exportação de pólen ocorre de forma mais homogênea, logo o comprimento do tubo floral é mantido através de ambos os componentes do *fitness*.

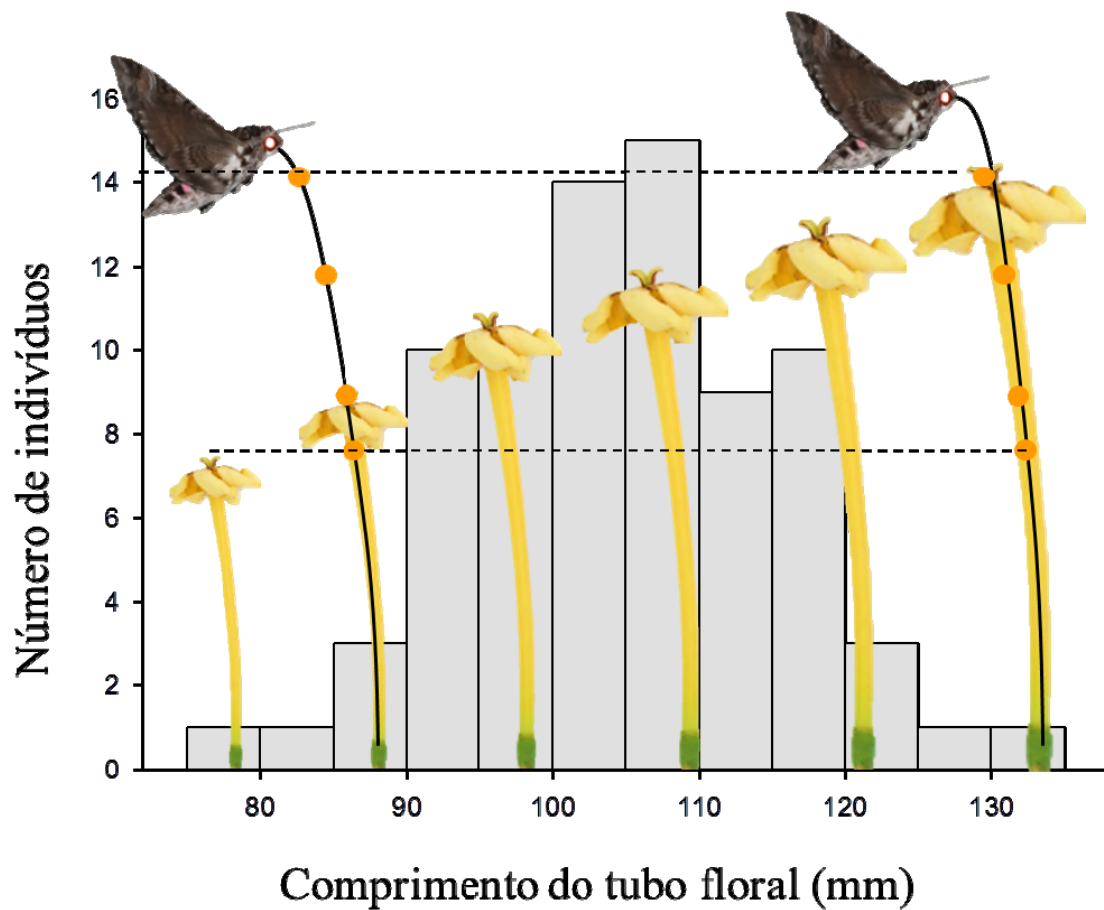


Figura 6. Mecanismo de transferência de pólen em *Tocoyena formosa* ilustrando como tubos florais, cujo comprimento excede o comprimento médio da população, atuam principalmente como receptores de pólen na população, enquanto aquelas flores com tubos mais curtos atuam principalmente como doadoras de pólen, e virtualmente pode doar pólen para todos os demais indivíduos na população. O histograma em cinza representa a distribuição dos tubos florais na população estudada, e os pontos laranja na probóscide da mariposa representam as massas de pólen de *T. formosa*.

Considerações finais

Os resultados de nosso estudo fornecem evidências que suportam a hipótese de seleção dependente do gênero do componente do *fitness*, porém, é importante destacar que a fauna de esfingídeos (Haber & Frankie 1989, Moré et al. 2012, Amorim et al. 2013) e de predadores de sementes (Kolb et al. 2007) podem ser temporalmente variáveis. Tais flutuações na composição e frequência dos interagentes podem influenciar a intensidade da seleção imposta pelos polinizadores através do componente feminino do êxito reprodutivo (Gómez & Zamora 2000, Gómez 2008), assim como o balanço da seleção atuando através dos distintos componentes do *fitness* da planta (Ashman & Morgan 2004, Ellis & Johnson 2010). Por exemplo, em *Platathera bifolia* (Orchidaceae) foi observado maior intensidade do gradiente de seleção agindo sobre o display floral através do componente masculino do *fitness*, e seleção direcional positiva sobre o comprimento do tubo através do componente feminino do *fitness* somente durante a estação com menor disponibilidade hídrica (veja Maad & Alexandersson 2004). Em anos de menor frequência dos polinizadores e/ou maior abundância dos antagonistas, o efeito negativo dos predadores de sementes pode sobrepujar o efeito positivo dos polinizadores sobre o êxito reprodutivo feminino, e afetar o resultado da seleção fenotípica imposta pelos polinizadores. Acreditamos que em *T. formosa*, tal interferência será principalmente relevante caso a atividade dos antagonistas resulte em maior taxa de aborto dos frutos em desenvolvimento, uma vez a seleção natural sobre o comprimento do tubo floral ocorre devido a maior probabilidade de frutificação em flores com tubos maiores. O que reflete a importância da natureza do sistema de transferência de pólen, no qual o pólen é exportado em unidades discretas (tais como polínias, mássulas ou massas) na probóscide de seus polinizadores. Finalmente, além do efeito dos polinizadores e antagonistas, o resultado da seleção sobre o comprimento do tubo floral vai depender do balanço final da seleção imposta através dos componentes masculino e feminino do êxito reprodutivo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agosta, S. J. and Janzen, D. H. 2005. Body size distributions of large Costa Rican dry forest moths and the underlying relationship between plant and pollinator morphology. – *Oikos* 108: 183–193.
- Alexandersson, R. and Johnson, S. 2002. Pollinator-mediated selection on flower-tube length in a hawkmoth-pollinated *Gladiolus* (Iridaceae). – *Proceedings of the Royal Society* 269: 631–636.
- Amorim, F. W. et al. 2009. A hawkmoth crossroads? Species richness, seasonality and biogeographical affinities of Sphingidae in a Brazilian Cerrado. – *Journal of Biogeography* 36: 662–674.
- Amorim, F. W. et al. 2013. Beyond the pollination syndrome: nectar ecology and the role of diurnal and nocturnal pollinators in the reproductive success of *Inga sessilis* (Fabaceae). – *Plant Biol* 15: 317–327.
- Amorim, F. W. et al. 2014. Low abundance of long-tongued pollinators leads to pollen limitation in four specialized hawkmoth-pollinated plants in the Atlantic Rain forest, Brazil. – *Naturwissenschaften* 101: 893–905.
- Anderson, B. and Johnson, S. D. 2008. The geographical mosaic of coevolution in plant-pollinator mutualism. – *Evolution* 62: 220–225.
- Ashman, T. L. and Morgan, M. T. 2004. Explaining phenotypic selection on plant attractive characters: male function, gender balance or ecological context? – *Proc R Soc B* 271: 553–559.
- Bartkowska, M. P. and Johnson, M. O. 2012. Pollinators cause stronger selection than herbivores on floral traits in *Lobelia cardinalis* (Lobeliaceae). – *New Phytologist* 193: 1039–1048.
- Benitez-Vieyra, S. et al. 2006. Pollinator-mediated selection on flower traits and size of floral display in *Cyclopogon elatus*, a sweat bee-pollinated. – *Functional Ecology* 20: 948–957.
- Brody, A. K. and Mitchell, R. J. 1997. Effects of experimental manipulation of inflorescence size on pollination and pre-dispersal seed predation in the hummingbird-pollinated plant *Ipomopsis aggregata*. – *Oecologia* 110: 86–93.
- Campbell, D. R. 1989. Measurements of selection in a hermaphroditic plant: variation in male and female pollination success. – *Evolution* 43: 318–334.
- Cariveau, D., Irwin, R. E., Brody, A. K. et al. 2004. Direct and indirect effects of pollinators and seed predators to selection on plant and floral traits. – *Oikos* 104: 15–26.

- CEPAGRI, Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas à Agricultura. 2015. Clima dos Municípios Paulistas. Disponível em <<http://www.cpa.unicamp.br/outrasinformacoes/clima-dos-municipios-pailistas.html>> Acesso julho 2015.
- Darwin, C. R. 1862. On the various contrivances by which British and foreign orchids are fertilized by insects. – J Murray.
- Del-Claro, K. et al. 2013. Ants visiting the post-floral secretions of pericarpial nectaries in *Palicourea rigida* (Rubiaceae) provide protection against leaf herbivores but not against seed parasites. – *Sociobiology* 60: 217–221.
- Dodd, M. E. et al. 1999. Phylogenetic analysis of trait evolution and species diversity variation among angiosperm families. – *Evolution* 53: 732–44.
- Ehrlén, J. et al. 2002. Pollen limitation, seed predation and scape length in *Primula farinosa*. – *Oikos* 97: 45–51.
- Ellis, A. G. and Johnson, S. D. Gender differences in the effects of floral spur length manipulation on fitness in a hermaphrodite orchid. – *Int. J. Plant Sci.* 171: 1010–1019.
- Fenster, C. B. et al. 2004. Pollination syndromes and floral specialization. – *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 35: 375–403.
- Fishman, L. and Willis, J. H. 2008. Pollen limitation and natural selection on floral characters in the yellow monkeyflower, *Mimulus guttatus*. – *New Phytologist* 177: 802–810.
- Freitas, L. 2013. Concepts of pollinator performance: is a simple approach necessary to achieve a standardized terminology? *Braz. J. Bot.* 36: 3–8.
- Galen, C. and Cuba, J. 2001. Down the tube: pollinators, predators, and the evolution of flower shape in the alpine skypilot, *Polemonium viscosum*. – *Evolution* 55: 1963–1971.
- Gómez, J. M. 2003. Herbivory reduces the strength of pollinator-mediated selection in the mediterranean herb *Erysimum mediohispanicum*: consequences for plant specialization. – *The American Naturalist* 162: 242–256.
- Gómez, J. M. 2008. Sequential conflicting selection due to multispecific interactions triggers evolutionary trade-offs in a monocarpic herb. – *Evolution* 62: 668–679.
- Gómez, J. M. and Zamora, R. 2000 Spatial variation in the selective scenarios of *Hormathophylla spinosa* (Cruciferae). – *The American Naturalist* 155: 657–669.
- Haber, W. A. and Frankie, G. W. 1989. A tropical Hawkmoth Community: Costa Rican dry forest Sphingidae. – *Biotropica* 21: 155–172.
- Harder, L. D. and Johnson, S. D. 2009. Darwin's beautiful contrivances: evolutionary and functional evidence for floral adaptation. – *New Phytologist* 183: 530–545.

- Heil, M. and McKey, D. 2003. Protective ant-plant interactions as model systems in ecological and evolutionary research. – *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 34: 425–453.
- Herrera, C. M. 1993. Selection on floral morphology and environmental determinants of fecundity in a hawk moth-pollinated violet. – *Ecological Society of America* 63: 251–275.
- Herrera, C. M. 2000. Measuring the effects of pollinators and herbivores: evidence for non-additivity in a perennial herb. – *Ecology* 81: 2170–2176.
- Herrera, C.M. et al. 2002. Interaction of pollinators and herbivores on plant fitness suggests a pathway for correlated evolution of mutualism- and antagonism-related traits. – *PNAS* 99: 16823–16828.
- Johnson, S. D. and Steiner, K. E. 1997. Long-tongued fly pollination and evolution of floral spur length in the *Disa draconis* complex (Orchidaceae). – *Evolution* 51: 45–53.
- Johnson, S. D. and Raguso, R. A. 2014. The long-tongued hawkmoth pollinator niche for native and invasive plants in Africa. – *Annals of Botany* 117: 25–36.
- Kay, K. M. et al. 2006. Floral characters and species diversification. – In: Harder, L. D. and Barrett, S. C. H. (eds), *Ecology and evolution of flowers*. Oxford University Press, pp. 311–325.
- Keeler, K. H. 1981. Function of *Mentzelia muda* (Loasaceae) postfloral nectarines in seed defense. – *American Journal of Botany* 68: 295–299.
- Kingsolver, J. G. and Schemske, D. W. 1991. Path analysis of selection. – *Trends Ecol. Evol.* 6: 276–280.
- Knight, T. M. et al. 2005. Pollen limitation of plant reproduction: pattern and process. – *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 36: 467–497.
- Kolb, A. et al. 2007. Ecological and evolutionary consequences of spatial and temporal variation in pre-dispersal seed predation. – *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 9: 79–100.
- Larson, B. M. H and Barrett, S. C. H. 2000. A comparative analysis of pollen limitation in flowering plants. – *Biological Journal of the Linnean Society* 69: 503–520.
- Maad, J. 2000. Phenotypic selection in hawkmoth-pollinated *Platanthera bifolia*: targets and fitness surfaces. – *Evolution* 54: 112–123.
- Maad, J. and Alexandersson, R. 2004. Variable selection in *Platanthera bifolia* (Orchidaceae): phenotypic selection differed between sex functions in a drought year. – *J. Evol. Biol.* 17: 642–650.
- MacCallum, R. C. et al. 1996. Power analysis and determination of sample size for covariance structure modeling. – *Psychological Methods* 1: 130–149.

- McCall, A. C. and Irwin, R. E. 2006. Florivory: the intersection of pollination and herbivory. – *Ecology Letters* 9: 1351–1365.
- Martins, D. J. and Johnson, S. D. 2013 Interactions between hawkmoths and flowering plants in East Africa: polyphagy and evolutionary specialization in an ecological context. – *Biol J Linn Soc* 110: 199–213.
- Mitchell, R. J. 1992. Testing evolutionary and ecological hypothesis using path analysis and structural equation modelling. – *Functional Ecology* 6: 123–129.
- Moré, M. et al. 2012. Armament imbalances: match and mismatch in plant-pollinator traits of highly specialized long-spurred Orchids. – *PloS One* 7: 1–9.
- Morrissey, M. B. and Sakrejda, K. 2013. Unification of regression-based methods for the analysis of natural selection. – *Evolution* 67: 2094–2100.
- Mothershead, K. and Marquis, R. J. 2000. Fitness impacts of herbivory through indirect effects on plant-pollinator interactions in *Oenothera macrocarpa*. – *Ecology* 81: 30–40.
- Nilsson, L. A. 1988. Evolution of flowers with deep corolla tubes. – *Nature* 334: 147–149.
- Oliveira, P. S. and Gibbs, P. E. 2000. Reproductive biology of woody plants in a cerrado community of Central Brazil. – *Flora* 195: 311–329.
- Oliveira, P. E. et al. 2004. Moth pollination of woody species in the cerrados of central Brazil: a case of so much owed to so few? – *Plant Systematics and Evolution* 245: 41–54.
- Parachnowitch, A. L. and Caruso, C. M. 2008. Predispersal seed herbivores, not pollinators, exert selection on floral traits via female fitness. – *Ecology* 89: 1802–1810.
- Parachnowitch, A. L. and Kessler, A. 2010. Pollinators exert natural selection on flower size and floral display in *Penstemon difitalis*. – *New Phytologist* 188: 393–402.
- Pauw, A. et al. 2009. Flies and flowers in Darwin's race. – *Evolution* 63: 268–79.
- Pérez-Barrales, R. et al. 2013. Pollinators and seed predators generate conflicting selection on *Dalechampia* blossoms. – *Oikos* 122: 1411–1428.
- Ratter, J. A. et al. 2003. Analysis of the floristic composition of the Brazilian Cerrado vegetation III: comparison of the woody vegetation of 376 areas. – *Edinburgh Journal of Botany* 60:57–109.
- Rey, P. J. et al. 2006. The geographic mosaic in predispersal interactions and selection on *Helleborus foetidus* (Ranunculaceae). – *J. Evol. Biol.* 19:21–34.
- Rodríguez-Gironés, M. A. and Santamaría, L. 2007. Resource competition, character displacement, and the evolution of deep corolla tubes. – *The American Naturalist* 170: 456–464.
- Rosumek, F. B. et al. 2009. Ants on Plants: a meta-analysis of the role of ants as plant biotic defenses. – *Oecologia* 160: 5379–549.

- Sandring, S. and Ågren, J. 2009. Pollinator-mediated selection on flower display and flowering time in the perennial herb *Arabidopsis lyrata*. – *Evolution* 63: 1292–1300.
- Santos, J. C. and Del-Claro, K. 2001. Interação entre formigas, herbívoros e nectários extraflorais em *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlecht.) K. Schum. (Rubiaceae) na vegetação do cerrado. – *Revista Brasileira de Zoociências* 3: 77–92.
- Silberbauer-Gottsberger, I. 1972. Anthese und Bestubung der Rubiaceen *Tocoyena brasiliensis* und *T. formosa* aus dem Cerrado Brasiliens. – *Sterreichische Botanische Zeitschrift* 120: 1–13.
- Silberbauer-Gottsberger, I. and Gottsberger, G. 1975. Über sphingophile Angiospermen brasiliens. – *Plant Systematic and Evolution* 123: 157–184.
- Sletvold, N. et al. 2010. Pollinator-mediated selection on floral display, spur length and flowering phenology in the deceptive orchid *Dactylorhiza lapponica*. – *New Phytologist* 188: 385–392.
- Sletvold, N. and Ågren, J. 2014. There is more to pollinator-mediated selection than pollen limitation. – *Evolution* 68: 1907–1918.
- Sletvold, N. et al. 2015. Additive effects of pollinators and herbivores result in both conflicting and reinforcing selection on floral traits. – *Ecology* 96: 214–221.
- Stebbins, G. L. 1970. Adaptive radiation of reproductive characteristics in angiosperms. I. Pollination mechanisms. – *Annual Review of Ecology and Systematics* 1: 307–326.
- Strauss, S.Y. et al. 1996. Foliar herbivory affects floral characters and plant attractiveness to pollinators: implications for male and female plant fitness. – *The American Naturalist* 147: 1098–1107.
- Strauss, S. Y. and Irwin, R. E. 2004. Ecological and evolutionary consequences of multispecies plant-animal interactions. – *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 35: 435–466.
- Strauss, S. Y. and Whittall, J. B. 2006. Non-pollinator agents of selection on floral traits. – In: Harder, L. D. and Barrett, S. C. H. (eds.), *Ecology and evolution of flowers*. Oxford university press, pp. 120–139.
- Toräng, P. et al. 2008. Mutualists and antagonists mediate frequency-dependent selection on floral display. – *Ecology* 89: 1564–1572.
- Wood, S. N. 2006. *Generalized additive models: an introduction with R*. Boca Raton: Chapman and Hall/CRC. 391p.
- Wootton, J. T. 1993. Indirect effects and habitat use in an intertidal community: interaction chains and interactions modifications. – *The American Naturalist* 141: 71–89.

Zapata, T. R. and Arroyo, M. T. K. 1978. Plant reproductive ecology of a secondary deciduous tropical forest in Venezuela. – *Biotropica* 10: 221–230.

Material Suplementar

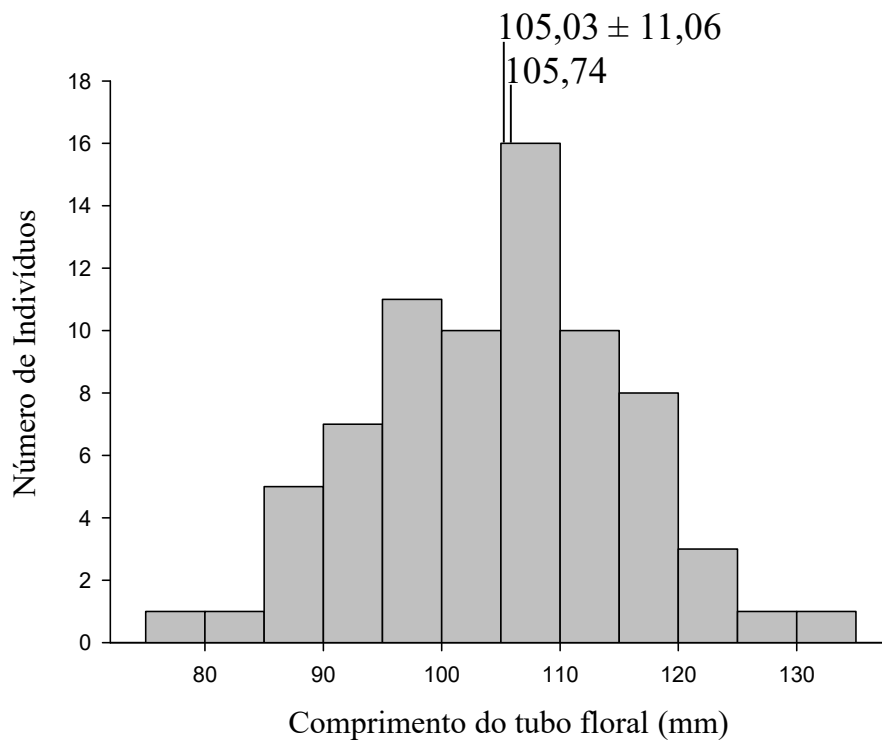


Figura 1S. Distribuição do comprimento do tubo floral (média \pm DP e mediana) de *Tocoyna formosa* na população de Pratânia-SP (W= 0,995; P=0,990; N=74 plantas).

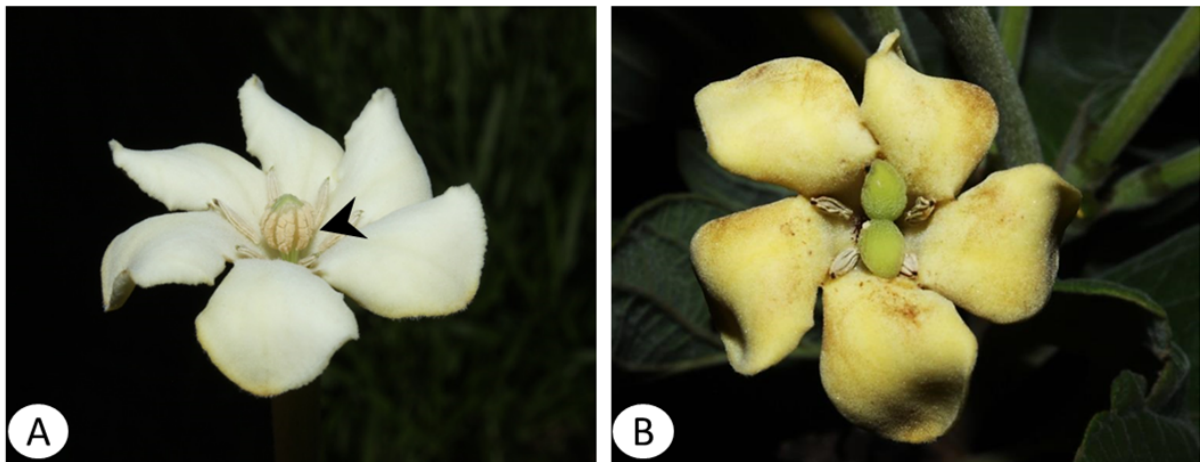


Figura 2S. Flor de *Tocoyna formosa*; (A) flor na primeira noite de antese, note (cabeça de seta) grãos de pólen apresentados sobre os lobos fechados do estigma; (B) flor na segunda noite de antese com lobos estigmáticos abertos.

Tabela 1S. Valores médios (\pm DP), amplitude e coeficientes de variação (c.v.) do comprimento do tubo floral e número de flores entre as plantas do experimento de exclusão (N=42 plantas).

	Média \pm DP	Amplitude	c.v.
Comprimento do tubo floral (mm)	101,44 \pm 9,69	76,81-118,31	0,10
Nº de flores por planta	109,98 \pm 82,95	20-424	0,75

Tabela 2S. Tratamentos do experimento de exclusão.

Tratamento	Polinização	Predadores	Formigas
1	Polinização Natural	Presença	Ausência
2	Polinização Natural + Suplementação de Pólen	Presença	Presença
3	Suplementação de Pólen	Ausência	Ausência
4	Polinização Natural	Presença	Presença

Tabela 3S. Resultado do experimento de exclusão (média \pm DP) para cada medida de êxito reprodutivo feminino por tratamento em 42 plantas.

Tratamento	Proporção de frutos iniciados	Proporção de frutos desenvolvidos	Nº médio de sementes por fruto
1	0,46 \pm 0,20	0,89 \pm 0,17	39 \pm 17
2	0,55 \pm 0,13	0,90 \pm 0,17	40 \pm 15
3	0,49 \pm 0,22	0,89 \pm 0,20	54 \pm 21
4	0,47 \pm 0,16	0,91 \pm 0,13	40 \pm 14

Tratamento: 1 – polinização natural, livre acesso de predadores e exclusão de formigas; 2 – Suplementação de pólen em flores abertas a visitação, livre acesso d predadores e formigas; 3 – Suplementação de pólen em flores isoladas dos polinizadores, exclusão de predadores e formigas; 4 – controle, condições naturais.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Sistemas de polinização por mariposas com longas probóscides estão amplamente distribuídos nos ecossistemas tropicais (Bawa 1985; Haber & Frankie 1989; Oliveira *et al.* 2004; Martins & Johnson 2013). E, embora alguns estudos tenham destacado a importância da seleção mediada por polinizadores em espécies estritamente esfingófilas (Alexandersson & Johnson 2002; Maad & Alexandersson 2004; Ellis & Johnson 2010), no Brasil poucos trabalhos têm avaliado a interação entre plantas esfingófilas e seus polinizadores dentro de um contexto evolutivo (Moré *et al.* 2012; Benitez-Vieyra *et al.* 2014). No Cerrado a polinização por mariposas possui fundamental importância para a reprodução de algumas das espécies mais abundantes desse bioma, apesar desse sistema de polinização compreender apenas *ca.* de 5% da flora de angiospermas (Oliveira *et al.* 2004). Neste sentido, o presente estudo é o primeiro a explorar a ocorrência de seleção natural sobre a morfologia floral em uma espécie esfingófila altamente especializada do bioma Cerrado. Embora estudos prévios tenham fornecido evidências de seleção mediada por polinizadores e antagonistas em outras regiões (Herrera 1993; Galen & Cuba 2001; Cariveau *et al.* 2004; Gómez 2008; Toräng *et al.* 2008), este é o primeiro a quantificar experimentalmente e feito conjunto de mutualistas e antagonistas na evolução da morfologia floral em uma espécie da flora brasileira, em particular do Cerrado.

No **Capítulo I** demonstramos que a associação com formigas através dos nectários pericárpicos não confere proteção aos frutos cujas sementes são predadas por larvas, principalmente de curculionídeos e vespas. Portanto, as formigas não influenciaram a reprodução de *Tocoyena formosa* durante a estação reprodutiva estudada. Embora, diversos fatores possam influenciar o resultado das interações facultativas (Bronstein 1994), variações na quantidade de recursos e na fauna de formigas não parecem afetar o resultado da interação planta-formiga. Ainda que espécies de formigas agressivas e dominantes, como *Ectatomma tuberculatum* possam efetivamente preda os curculionídeos, características comportamentais, assim como, a natureza endofítica dos principais predadores de sementes, provavelmente, contribuíram para a ineficiência das formigas.

Entretanto, no **Capítulo II**, evidenciamos que o efeito negativo dos predadores de semente pré-dispersão sobre o ERF de *T. formosa* não interfere no padrão e na força da seleção imposta pelos polinizadores sobre o comprimento do tubo floral. Tais evidências também sugerem que a ocorrência de seleção fenotípica sobre o comprimento do tubo floral

está diretamente relacionada com a elevada efetividade do serviço de polinização e com o mecanismo de transferência de pólen, uma vez que:

- I) A deposição de uma massa de pólen na probóscide das mariposas em altura correspondente ao tamanho do tubo floral fornece evidências de que a transferência de pólen ocorre preferencialmente entre flores cujo tubo da corola é igual ou maior que o tubo da flor doadora.
- II) A elevada taxa de frutificação pode contribuir diretamente para o efeito dos caracteres florais sobre o ERF, particularmente no sistema de *T. formosa*, no qual a produção de frutos depende da habilidade da planta, favorecida pela morfologia floral, em receber pólen dos demais indivíduos da população.
- III) A elevada frequência e efetividade dos polinizadores ao aumentar a importância do número de frutos iniciados diminui a importância dos predadores de sementes pré-dispersão que atuam sobre o número de sementes por fruto.

Neste contexto, a elevada taxa de frutificação também pode estar relacionada à ausência de efeito das formigas. Assim, ao diminuir a importância dos predadores de sementes para o êxito reprodutivo feminino (veja Capítulo II), a elevada taxa de frutificação pode, indiretamente, diminuir a necessidade de proteção dos frutos e sementes, reduzindo a importância das formigas para o ERF.

Uma vez que a frequência de visitas e a composição da fauna de esfingídeos podem sofrer flutuações temporais (Haber & Frakie 1989; Amorim *et al.* 2009; Moré *et al.* 2012), uma menor taxa de frutificação, além de diminuir a importância dos caracteres florais para o êxito reprodutivo feminino (ERF), também poderia intensificar o efeito dos predadores sobre o ERF (Gómez & Zamora 2000). Neste sentido, caso predadores reduzam drasticamente o número total de sementes na planta e/ou levem a uma maior taxa de aborto dos frutos, poderiam interferir sobremaneira na seleção mediada pelos polinizadores (Herrera 2000).

Por outro lado, mutualismos facultativos, tal como a interação entre formigas e os NPP de *T. formosa*, são altamente condicionais, o que sugere que as formigas podem ser mais efetivas em outras estações reprodutivas (Bronstein 1994). O efeito defensivo das formigas contra os predadores de sementes pode ser particularmente evidente em períodos nos quais, o efeito negativo dos predadores tenha maior importância para o *fitness* da planta, seja devido ao aumento da taxa de predação ou devido ao efeito indireto da menor taxa de frutificação.

Embora espécies autoincompatíveis com sistemas altamente especializados de polinização geralmente tendam a possuir distribuições mais restritas (veja Grossenbacher *et*

al. 2015), a ampla distribuição de *T. formosa*, possivelmente está relacionada a elevada efetividade do serviço de polinização por mariposas com longas probóscides (veja Capítulo II). Por outro lado, em anos de menor frutificação, o ERF de *T. formosa* pode sofrer maior influência dos predadores de sementes pré-dispersão e das formigas defensivas, cujos efeitos podem ser mutuamente dependentes e extremamente variáveis (Bronstein 1994; Kolb *et al.* 2007). O que reforça a importância de se considerar a influência das interações multitróficas sobre o *fitness* das plantas e para processos de seleção fenotípica sobre a morfologia floral (Strauss & Irwin 2004).

Adicionalmente, é necessário destacar que o efeito da seleção sobre o comprimento do tubo depende do balanço das pressões seletivas atuando através dos dois componentes do êxito reprodutivo (Campbell 1989; Ellis & Johnson 2010). Neste sentido, para entender a importância da seleção mediada por polinizadores para a evolução e distribuição do comprimento do tubo floral nas populações, estudos futuros devem avaliar a influência simultânea dos componentes feminino e masculino do *fitness* sobre a evolução da morfologia floral de *Tocoyena formosa*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMORIM, F.W. ÁVILA, R.S. CAMARGO, A.J.A.; VIEIRA, A.L.; OLIVEIRA, P.E. 2009. A hawkmoth crossroads? Species richness, seasonality and biogeographical affinities of Sphingidae in a Brazilian Cerrado. *Journal of Biogeography* 36: 662-674.
- ALEXANDERSSON, R.; JOHNSON, S. 2002. Pollinator-mediated selection on flower-tube length in a hawkmoth-pollinated *Gladiolus* (Iridaceae). *Proceedings of the Royal Society* 269: 631-636.
- BAWA, K.S.; BULLOCK, S.H. PERRY, D.R.; COVILLE, R.E.; GARAYUM, M.H. 1985. Reproductive biology of tropical lowland rain forest trees. II. Pollination systems. *American Journal of Botany* 72: 346-356.
- BENITEZ-VIEYRA, S.; MORÉ, M.; AMORIM, F.W. 2014. Seleção Fenotípica mediada por polinizadores. *In* Rech AR; Agostine K; Oliveira PE; Machado IC. (eds.). *Biologia da polinização*. Rio de Janeiro, BR: Projeto Cultural, 349-371.
- BRONSTEIN, J. 1994. Conditional outcomes in mutualistic interactions. *TREE* 9: 214-217.
- CAMPBELL, D.R. 1989. Measurements of selection in a hermaphroditic plant: variation in male and female pollination success. *Evolution* 43: 318-334.
- CARIVEAU, D.; IRWIN, R.E.; BRODY, A.K.; GARCIA-MAYEYA, L.S.; VON DER OHE, A. 2004. Direct and indirect effects of pollinators and seed predators to selection on plant and floral traits. *Oikos* 104: 15-26.
- ELLIS, A.G.; JOHNSON, S.D. Gender differences in the effects of floral spur length manipulation on fitness in a hermaphrodite orchid. *Int. J. Plant Sci.* 171: 1010-1019.
- GALEN, C.; CUBA, J. 2001. Down the tube: pollinators, predators, and the evolution of flower shape in the alpine skipper, *Polemonium viscosum*. *Evolution* 55: 1963-1971.
- GÓMEZ, J.M. 2008. Sequential conflicting selection due to multispecific interactions triggers evolutionary trade-offs in a monocarpic herb. *Evolution* 62: 668-679
- GÓMEZ, J. M.; ZAMORA, R. 2000. Spatial variation in the selective scenarios of *Hormathophylla spinosa* (Cruciferae). *The American Naturalist* 155: 657-669.
- GROSSENBACHER, D.; RUNQUIST, R.B.; GOLDBERG, E.E; BRANDVAIN, Y. 2015. Geographic range size is predicted by plant mating system. *Ecology Letters* 18: 706-713.
- HABER, W.A.; FRANKIE, G.W. 1989. A tropical Hawkmoth Community: Costa Rican dry forest Sphingidae. *Biotropica* 21: 155-172.

- HERRERA, C. M. 1993. Selection on floral morphology and environmental determinants of fecundity in a hawk moth-pollinated violet. – *Ecological Society of America* 63: 251–275.
- HERRERA, C. M. 2000. Measuring the effects of pollinators and herbivores: evidence for non-additivity in a perennial herb. *Ecology* 81: 2170-2176.
- KERSCH, M. F.; FONSECA, C. R. 2005. Abiotic factors and the conditional outcome of an ant-plant mutualism. – *Ecology* 86: 2117–2126.
- KOLB, A.; EHRLÉN, J.; ERIKSSON, O. 2007. Ecological and evolutionary consequences of spatial and temporal variation in pre-dispersal seed predation. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 9: 79-100.
- MAAD, J.; ALEXANDERSSON, R. 2004. Variable selection in *Platanthera bifolia* (Orchidaceae): phenotypic selection differed between sex functions in a drought year. *J. Evol. Biol.* 17: 642-650.
- MORÉ, M.; AMORIM, F.W.; BENITEZ-VIEYRA, S.; MARTIN, M.A.; SAZIMA, M.; COCUCCI, A.A. 2012. Armament imbalances: match and mismatch in plant-pollinator traits of highly specialized long-spurred Orchids. *PloS One* 7: 1-9.
- MARTINS, D. J.; JOHNSON, S. D. 2013 Interactions between hawkmoths and flowering plants in East Africa: polyphagy and evolutionary specialization in an ecological context. *Biol J Linn Soc* 110: 199-213.
- OLIVEIRA, P.E.; GIBBS, P.E.; BARBOSA, A.A. 2004. Moth pollination of woody species in the cerrados of central Brazil: a case of so much owed to so few? *Plant Systematics and Evolution* 245: 41-54.
- STRAUSS, S.Y.; IRWIN, R.E. 2004. Ecological and evolutionary consequences of multispecies plant-animal interactions. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 35: 435-466.
- TORÄNG, P.; EHRLÉN, J.; ÅGREN, J. 2008. Mutualists and antagonists mediate frequency-dependent selection on floral display. *Ecology* 89: 1564-1572.