

INTERAÇÕES MUTUALISTAS AO LONGO DA ONTOGENIA DE UMA ESPÉCIE DE LEGUMINOSA: BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO, FORMIGAS PROTETORAS E ABELHAS POLINIZADORAS

LORENA BUENO VALADÃO MENDES

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus 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
2018**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

INTERAÇÕES MUTUALISTAS AO LONGO DA ONTOGENIA
DE UMA ESPÉCIE DE LEGUMINOSA: BACTÉRIAS
FIXADORAS DE NITROGÊNIO, FORMIGAS PROTETORAS E
ABELHAS POLINIZADORAS

LORENA BUENO VALADÃO MENDES

ANSELMO NOGUEIRA

ORIENTADOR

ELZA MARIA GUIMARÃES

CO-ORIENTADORA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus 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
2018**

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

Mendes, Lorena Bueno Valadão.

Interações mutualistas ao longo da ontogenia de uma espécie de leguminosa : bactérias fixadoras de nitrogênio, formigas protetoras e abelhas polinizadoras / Lorena Bueno Valadão Mendes. - Botucatu, 2018

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

Orientador: Anselmo Nogueira

Coorientador: Elza Guimarães

Capes: 20300000

1. Ecologia. 2. Mutualismo. 3. Rizóbio. 4. Nitrogênio - Fixação. 5. Ontogenia.

Palavras-chave: Fixação de nitrogênio; Interações ecológicas; Mutualismo; Ontogenia; Rizóbio.

Aos meus pais, Elizeu e Gislane, por me mostrarem que às conquistas só vem para aqueles que se mantêm de pé, mesmo após terem caído diversas vezes.

Ainda, dedico a todas as pessoas que, apesar de se sentirem fracas e incapazes em vários momentos, acreditaram em si e continuaram firmes em busca dos seus sonhos.

Agradecimentos

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela bolsa de estudos concedida durante esses dois anos de mestrado.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Anselmo Nogueira**, por todo apoio, pela motivação e amizade nos momentos de desespero (que não foram poucos) e por acreditar no meu potencial desde o primeiro e-mail trocado. Por toda paciência em me ensinar, desde o mais básico ao mais avançado. Por ter decretado a mim essa missão de desenvolver esse trabalho e por crer que eu seria capaz. Por ter me trago dúvidas, ao invés de verdades absolutas. Mas principalmente, serei eternamente grata, por ter me transferido essa sua enorme paixão pela pesquisa e pela ciência que antes era só sua, mas que a partir de agora após ter sido compartilhada, passou a ser minha também. Muito obrigada.

Agradeço à minha co-orientadora, **Prof. Dra. Elza Guimarães**, pela ótima co-orientação e paciência, pelo tempo dedicado ao meu trabalho, suporte, auxílio e pelo conhecimento compartilhado.

Agradeço à **Prof. Dra. Carmen Silva Fernandes Boaro**, pelo suporte e desprendimento em ajudar na colaboração de várias etapas cruciais deste suporte.

Ao **Prof. Dr. Luiz Fernando Rolim de Almeida**, pelo apoio e suporte em vários momentos durante o desenvolvimento desse trabalho.

Ao **Prof. Dr. Danilo da Cruz Centeno**, pelo auxílio no desenvolvimento desse projeto e por ter cedido o espaço do laboratório e materiais necessários para que eu pudesse realizar diversos estágios dessa dissertação.

Ao **Prof. Dr. Erico F. L. Pereira-Silva**, pelo auxílio e disponibilização de materiais necessário para vários momentos do experimento em casa de vegetação.

À **Universidade Estadual Paulista – UNESP/Botucatu**, ao **Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Botânica)**, e a todos os professores e funcionários, muito obrigada pelo suporte.

Agradeço às alunas do **Laboratório de Ecologia e Evolução das Interações Planta-Animal – UNESP/Botucatu**, em especial **Marília, Camila e Bruna**, por terem me acolhido e me dado suporte em vários momentos.

Ao **Laboratório de Fisiologia Vegetal – UNESP/Botucatu**, e em especial ao aluno **Felipe Giroto**, pelo auxílio em diversas etapas.

À **Associação dos Docentes (AD) – UNESP/Botucatu**, por permitir que eu desenvolvesse às etapas de campo desse projeto em sua área.

Agradeço à **Universidade Federal do ABC – UFABC/São Bernardo**, ao **Centro de Ciências Naturais e Humanas**, e todos os professores e funcionários que me deram suporte.

Ao **Laboratório de Evolução e Diversidade I e II – UFABC/São Bernardo**, e em especial aos alunos **João Paulo Naldi** e **Marcia Gonçalves Dias**, por me ensinar e auxiliar nos experimentos.

Às **Centrais Experimentais Multiusuário (CEMs) – UFABC/ Santo André** e todos os funcionários pelo suporte no desenvolvimento de algumas etapas desse projeto.

Às minhas colegas de laboratório, **Nathália** e **Tamires**, e ao aluno **Caian Gerolamo**, por terem me auxiliado em várias etapas muito importantes desse projeto. Sem vocês, vários procedimentos teriam sido impossíveis de serem realizados.

À **Universidade Federal de Uberlândia – UFU/Ituiutaba**, ao meu orientador da graduação **Lucas Matheus da Rocha**, e todos aqueles professores que sempre me estimularam a almejar por mais e que me auxiliaram na conquista de chegar ao mestrado.

Agradeço a **todos os professores** que em algum momento destes 24 meses fizeram parte da minha construção teórica e prática e que hoje me possibilitaram estar aqui, finalizando a minha dissertação.

Aos meus amigos que Botucatu me trouxe, **July, Rã, Suin, Tay, Cine, Wandi, Kati, Angel, Mirrada, Juan** e **Nat**, por terem preenchido com carinho e amor parte desse enorme vazio que a pós-graduação nos deixa. Em especial agradeço às amigas, **Di** e **Thats**, por terem estado presente desde o início da minha jornada aqui. Pelas conversas, desabafos, tardes e noites de desespero compartilhadas, pelas risadas e principalmente por essa enorme amizade.

Aos meus amigos da **turma do fundão**, que vieram da graduação, mas permanecem comigo até e que hoje fazem parte da minha segunda família. Gratidão pelo acolhimento nos momentos difíceis, pelas conversas jogada fora naqueles momentos de estresse e pelo ombro amigo nos momentos difíceis. Em especial aos amigos, irmãos, **Luiz** e **Leo**, por me receberem sempre de braços abertos naqueles dias pesados, em que parecia impossível seguir em frente. Obrigada pelos abraços carinhosos e por me terem me consolado e alegrado nas etapas difíceis dessa jornada.

À **minha família** (avós, tios e primos), pela compreensão à ausência em vários momentos de família e pelas mensagens de apoio. Em especial, aos pequenos **Renan, Lucca** e **Eloá**, por preencherem a minha vida com sorrisos e abraços sinceros e por manterem acesso em mim o brilho da vida e a certeza de que dias melhores virão.

Agradeço aos meus pais, **Elizeu** e **Gislane**, e a minha irmã **Hellen**, por terem compreendido minha ausência em datas comemorativas, aniversários e festas de família. Por terem se acostumado a me ter longe, mas ao mesmo tempo tão perto. Por terem aberto mão da minha

companhia quando eu escolhi trocar o conforto de casa pela conquista do mundo próprio. Agradeço por terem sido meu esteio firme quando todos os outros pareciam ser muitas vezes, instáveis. Por terem sido pacientes e bons ouvintes, mesmo quando não entendiam nada. Por terem tirado uma parte do seu tempo para me ajudar na “força bruta” e também me apoiar, mesmo que apenas com palavras de conforto (de que tudo iria ficar bem). Devo a vocês essa minha conquista. Obrigada!

E por fim, gratidão **a todos os envolvidos**, que me acompanharam nesse ciclo, que hoje se encerra.

Courage does not always roar. Sometimes courage is the quiet voice at the end of the day saying "I will try again tomorrow".

Interações mutualistas ao longo da ontogenia de uma espécie de leguminosa: bactérias fixadoras de nitrogênio, formigas protetoras e abelhas polinizadoras

Lorena Bueno Valadão-Mendes¹, Anselmo Nogueira^{2,3}, Elza Guimarães², Carmen Silva Fernandes Boaro², Danilo da Cruz Centeno³

¹ Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Botânica), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, São Paulo, Brasil.

² Departamento de Botânica, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, São Paulo, Brasil.

³ Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC, Campus de São Bernardo, SP, Brasil.

***Em fase de preparação para submissão na revista *Ecology*.**

Sumário

Resumo	11
Abstract.....	13
1. Introdução.....	15
1.1. Ontogenia, alocação de recursos das plantas e estabelecimento dos mutualismos	15
1.2. Interferência entre mutualismos	16
2. Objetivos, perguntas e hipóteses	18
3. Material e métodos	19
3.1. Área de estudo e espécie vegetal	19
3.2. Delineamento amostral.....	21
3.3. Descritores do corpo vegetal em plantas de diferentes tamanhos no campo	21
3.3.1. Tamanho das plantas, biomassa vegetal e estádios ontogenéticos	21
3.3.2. Medidas de clorofila, proteínas totais e relação C/N foliar	22
3.4. Descritores das plantas associados aos mutualistas	23
3.4.1. Néctar extrafloral foliar	23
3.4.2. Produção de flores e quantificação de proteínas totais dos grãos de pólen.....	23
3.5. Descritores das interações mutualistas	24
3.5.1. Descrição das visitas de formigas e abelhas às plantas	24
3.5.2. Contagem de nódulos radiculares.....	25
3.6. Etapa experimental em casa de vegetação: manipulando às bactérias do tipo rizóbio	25
3.7. Análises estatísticas	27
4. Resultados.....	28
4.1. Variação do tamanho das plantas de <i>Chamaecrista desvauxii</i> var. <i>latistipula</i> e estabelecimento das interações mutualistas	28
4.2. Efeito da interação mutualista raiz-rizóbio, produção de néctar extrafloral e flores..	30
4.3. Recursos das plantas associados aos mutualistas	31
5. Discussão	31
5.1. Estabelecimento das interações mutualistas ao longo da ontogenia das plantas.....	32
5.2. Efeito da interação mutualista raiz-rizóbio sobre a produção de néctar extrafloral e visitas de formigas.....	35
5.3. Efeito da interação mutualista raiz-rizóbio sobre a produção de flores e visitas de abelhas.....	37
6. Considerações finais	38
7. Referências	40

Tabelas.....	46
Figuras e Gráficos.....	49

VALADÃO-MENDES, L.B. **INTERAÇÕES MUTUALISTAS AO LONGO DA ONTOGENIA DE UMA ESPÉCIE DE LEGUMINOSA: BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO, FORMIGAS PROTETORAS E ABELHAS POLINIZADORAS.** 2018. 59p. DISSERTAÇÃO (MESTRADO) – INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”, BOTUCATU.

Resumo. Muitas características fenotípicas das plantas mudam drasticamente ao longo do desenvolvimento vegetal e podem influenciar as interações ecológicas. Dado que existe um custo energético associado a manutenção de diferentes mutualismos, investigamos a relação entre os estádios de desenvolvimento vegetal e o estabelecimento de três mutualismos, assim como a possível interferência do mutualismo raiz-rizóbio sobre os mutualismos nectário extrafloral-formiga e flor-abelha. No campo selecionamos 30 plantas da espécie de leguminosa de Cerrado, *Chamaecrista desvauxii* var. *latistipula*, com diferentes tamanhos, de indivíduos juvenis a maiores reprodutivos, para avaliar a ocorrência e intensidade das interações mutualistas raiz-rizóbio, nectário extrafloral-formiga e flor-abelha. Em casa de vegetação montamos um experimento manipulando as bactérias do tipo rizóbio e o tipo de solo em que as plantas foram cultivadas, no qual investigamos a interferência da interação raiz-rizóbio sobre os recursos vegetais disponíveis para outros mutualismos. As plantas amostradas em campo variaram entre 4 a 1300 unidade de tamanho. A interação raiz-rizóbio e nectário extrafloral-formiga ocorreu em plantas ainda muito pequenas, enquanto a interação flor-abelha se estabeleceu em plantas maiores. A intensidade da interação teve padrão exponencial para os nódulos radiculares e visitação das abelhas, e quadrático para as formigas. Esses padrões distintos na intensidade dos mutualismos sugeriram possível interferência entre eles, dado que a quantidade de nódulos radiculares e a interação flor-abelha aumentou e a interação nectário extrafloral-formiga diminuiu. Quanto às plantas do experimento, aquelas com rizóbio cresceram mais do que as plantas sem rizóbio, mas esse resultado variou dependendo do tipo de solo. Em solo rico em matéria orgânica, não encontramos diferenças no crescimento das plantas com e sem rizóbio, diferentemente das plantas cultivadas em areia. O volume do néctar secretado e o conteúdo total de açúcares foi maior em plantas com rizóbio, mas o resultado também foi variável entre tipos de solo. Plantas em areia e sem rizóbio não produziram néctar, e as demais condições experimentais não tiveram diferenças nos descritores do néctar. No entanto, a produção de néctar foi semelhante entre condições em que as plantas eram muito distintas em tamanho, sugerindo que plantas em solo rico em matéria orgânica, independente da presença de rizóbio, são mais eficientes na produção de néctar. Os diferentes estádios

ontogenéticos da espécie compreendem diferenças no estabelecimento, manutenção e intensidade das interações mutualistas. Ainda, nossos resultados apontam que exista interferência entre mutualismos, dado que o aumento na intensidade da interação de um mutualismo pode favorecer ou desfavorecer interação de outros mutualismos.

Palavras-chave: Contexto dependência, fixação de nitrogênio, interações ecológicas, Fabaceae, mutualismo, nectário extrafloral, polinização por vibração, rizóbio, *Chamaecrista*

VALADÃO-MENDES, L.B. **MUTUALISTIC INTERACTIONS ALONG PLANT ONTOGENY OF A LEGUME SPECIES: NITROGEN-FIXING BACTERIA, PROTECTIVE ANTS AND POLLINATING BEES.** 2018. 59p. DISSERTAÇÃO (MESTRADO) – INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”, BOTUCATU.

Abstract. Plant phenotypic traits change drastically throughout plant development and can modify ecological interactions. Whereas there is an energy cost associated with maintenance of different mutualisms on the same plant, we investigated the relationship between plant development and the establishment of multiple mutualisms. Besides, we evaluated the possible interference of the root-rhizobia mutualism on extrafloral nectary-ant and flower-bee mutualisms. In the field, we selected 30 plants of Cerrado legume species, *Chamaecrista desvauxii* var. *latistipula*, with different sizes, from juvenile to reproductive individuals, to evaluate the occurrence and intensity of root-rhizobia, extrafloral nectary-ant and flower-bee interactions. In a greenhouse, we manipulate the rhizobia bacteria and soil type, investigating the interference of root-rhizobia on plant resources available for other mutualisms. Plants sampled in field ranged from 4 to 1300 plant size. Root-rhizobia and extrafloral nectary-ant interactions occurred on tiny plants, while flower-bee interaction was established on larger plants. The strength of interactions had an exponential pattern for root nodules and bee visitation, and quadratic for ant visitation. These distinct patterns suggested a possible interference between mutualisms since the number of root nodules and the flower-bee interaction increased and the extrafloral nectary-ant interaction decreased. Moreover, in the rhizobium exclusion experiment, plants with inoculated rhizobia grew more than plants without rhizobia, but this pattern varied depending on the soil type. In soil richer in organic matter and nitrogen, we did not find differences in the growth of plants with and without rhizobia, differently from plants grown in sandy soil. Nectar volume and total sugar content were higher in plants with rhizobia, but this pattern was also variable among soil types. Plants in sandy soil without rhizobia did not exudate nectar, while plants from the remaining experimental conditions exudate similar volumes of nectar and sugar content. Nevertheless, nectar secretion was similar between conditions in which plants had very different sizes, suggesting that plants in soil richer in organic matter, independent of the presence of *Rhizobium*, are more efficient in nectar production. In this study, plant ontogenetic stages were related to differences in the establishment, maintenance and strength of mutualism interactions. Furthermore, our results indicate that there is an interference between mutualisms, given that the increase in the first mutualism may increase or decrease interactions with subsequent mutualisms.

Key-words: buzz pollination, context dependency, ecological interactions, extrafloral nectaries, Fabaceae, mutualism, nitrogen-fixation, *Rhizobium*, *Chamaecrista*

1. Introdução

Os mutualismos, interações de exploração mútua com saldo positivo para ambas as espécies, são componentes críticos de processos ecológicos e evolutivos que percorrem escalas que vão desde o indivíduo ao ecossistema (Jordano et al. 2003, Bronstein et al. 2015). Todo organismo provavelmente está envolvido em pelo menos um e geralmente vários mutualismos durante sua vida (Bronstein 2001). Foi estimado, por exemplo, para diferentes espécies de plantas, que até 20% do carbono alocado pode ser direcionado para manter mutualistas no sistema radicular (Johnson et al. 1997, Bronstein 2001). Em particular, parte da nutrição vegetal, como a absorção de fósforo e a fixação de nitrogênio atmosférico, é mediada por interações mutualistas das plantas com micorrizas e bactérias do tipo rizóbio associadas ao sistema radicular (Smith e Smith 2011). Adicionalmente, as interações mutualistas entre as flores e diferentes grupos de animais são responsáveis pela reprodução sexuada de grande parte das angiospermas (Bronstein et al. 2006). Essas interações são mediadas por recursos disponibilizados pelas plantas, em geral à base de carboidratos (Pringle 2015), e é esperado que o custo de produção desses recursos seja compensado pelos benefícios dos serviços prestados pelos animais (Bronstein 2001).

1.1. Ontogenia, alocação de recursos das plantas e estabelecimento dos mutualismos

A ontogenia refere-se ao desenvolvimento de um organismo baseado em mudanças morfológicas e fisiológicas através de uma série de estádios (McKinney e McNamara 1991, Barton e Boege 2017). Muitas características fenotípicas mudam drasticamente ao longo do crescimento e desenvolvimento do corpo da planta (Evans 1972). Por exemplo, a biomassa total, em diferentes partes da planta, aumenta de acordo com o crescimento vegetal (Weiner 2004). Ainda, a capacidade de alocação de recursos para diferentes funções, como para defesa e reprodução, pode variar ao longo do desenvolvimento da planta (Herms e Mattson 1992, Farnsworth 2004, Weiner 2004). Isso é impulsionado pela capacidade de aquisição de recursos e pela atribuição destes recursos pelas plantas em cada estágio ontogenético (Ochoa-López et al. 2015). Essas mudanças fisiológicas e morfológicas ao longo da ontogenia da planta podem influenciar de forma positiva e/ou negativa nas interações das plantas com outros organismos (Boege e Marquis 2005). Em particular, o estabelecimento das interações mutualistas depende do estágio de desenvolvimento da planta, pois este determina os recursos que podem ser disponibilizados para sua manutenção (Miller 2014).

Nos sistemas naturais, cada população de plantas inclui indivíduos de diferentes tamanhos e idades. Essa variação representa uma oportunidade para que possamos investigar como os mutualismos se estabelecem em diferentes estádios de desenvolvimento das plantas. Por exemplo, plantas maiores produzem mais flores e podem atrair mais polinizadores do que plantas menores com poucas flores (Schaffer e Schaffer 1979, Gerber 1985). Assim como o padrão temporal das exibições florais ou o número de dias em que as flores são produzidas pelas plantas, também podem afetar a atração de polinizadores (Wadgymer et al. 2015). De modo semelhante, muitas espécies vegetais possuem mudanças significativas em suas características de defesa, como diferenças na atividade dos nectários extraflorais à medida que as plantas se desenvolvem (Barton e Boege 2017). Apesar da ontogenia não ser sinônimo de idade ou tamanho, a disponibilidade de recursos muda à medida que as plantas crescem devido ao aumento da capacidade para alocação de recursos, assim como as prioridades na atribuição dos recursos à medida que as plantas se desenvolvem (Boege e Marquis 2005). Variações no tamanho do corpo vegetal podem ajudar a compreender as variações morfológicas e fisiológicas das plantas assim como as interações mutualistas ao longo dos estádios ontogenéticos (Barton e Boege 2017). Considerar explicitamente as variações no corpo da planta entre indivíduos em diferentes estádios ontogenéticos é relevante nos estudos de interações planta-animal porque os estádios podem determinar quando e como tais plantas podem interagir com parceiros mutualistas.

Em teoria, sob certas condições, os mutualistas oferecem benefícios às plantas, mas os custos relativos da sobreposição de diferentes mutualistas sobre a planta são desconhecidos (Pringle 2015). É esperado uma ordem no estabelecimento de diferentes mutualismos em uma mesma planta ao longo do seu desenvolvimento, e o primeiro mutualismo estabelecido pela planta poderia modificar as características fenotípicas da mesma ao longo do tempo, interferindo nos mutualismos estabelecidos subsequentemente. Portanto, é preciso compreender como a alocação ou distribuição dos recursos de determinada planta se modifica nos diferentes estádios ontogenéticos (Miller 2014). E ainda que essa variação nos recursos é importante para o entendimento de como as plantas respondem aos seus mutualismos ao longo do seu ciclo de vida (Miller 2014).

1.2. Interferência entre mutualismos

Embora os mutualismos entre plantas e insetos sejam os mais bem conhecidos (Bronstein 2001), são os mutualismos que se estabelecem no sistema radicular como micorrizas e as bactérias fixadoras de nitrogênio, que podem ter influência maior no balanço energético da

planta. No caso do mutualismo entre plantas e bactérias fixadoras de nitrogênio, parte dos fotoassimilados produzidos pela planta é direcionado para a raiz de acordo com o custo energético da fixação do nitrogênio (Peoples et al. 1986). Sabe-se que aproximadamente 15 mil espécies de plantas possuem associação com bactérias fixadoras de nitrogênio do tipo rizóbio, sendo que essa interação ocorre preponderantemente em representantes da família Leguminosae (Ballhorn et al. 2013). As bactérias do tipo rizóbio, ao estabelecerem os nódulos radiculares e iniciarem a fixação de nitrogênio, consomem de 13-28% de todos os fotoassimilados da planta (Dilworth et al. 2008). Em contrapartida, a interação com o rizóbio para a maioria das leguminosas, supre aproximadamente 80% da demanda de nitrogênio da planta (Sprent 2001). Ao tornar o nitrogênio que está inacessível no ambiente de forma disponível às plantas, essas associações não apenas influenciam o crescimento e o desenvolvimento das plantas (Dean et al. 2009), mas também as interações dessas plantas com outros organismos (e.g. herbívoros e patógenos, Van der Putten et al. 2001). Mais especificamente, a fixação de nitrogênio possibilitada pela interação raiz-rizóbio altera significativamente os recursos da planta, podendo reforçar as defesas químicas diretas (Kempel et al. 2009) e modificar as defesas bióticas indiretas frente aos herbívoros (Godschalx et al. 2015).

Dado que existe um custo da interação relacionado à manutenção das bactérias e ao processo de fixação de nitrogênio (Dilworth et al. 2008), pode ocorrer diminuição da disponibilidade de produtos à base de carboidratos nas plantas, tal como na produção de néctar. Em algumas espécies vegetais os nectários extraflorais secretam grandes quantidades de néctar que atuam como um mecanismo indireto de defesa da planta contra o ataque de herbívoros por meio da atração de formigas (McLain 1983). As formigas, ou pelo menos parte delas, enquanto forrageiam os nectários atuam como defensoras das plantas por predação ou expulsão de herbívoros que poderiam causar dano aos tecidos vegetais (Farji Brener et al. 1992). O néctar dos nectários extraflorais é composto essencialmente de açúcares, produto da fotossíntese (Godschalx et al. 2015). Plantas com associação com bactérias do tipo rizóbio podem causar a redução na quantidade de açúcar dissolvido no néctar secretado pelos nectários extraflorais, devido ao direcionamento constante de parte dos fotoassimilados às bactérias (Godschalx et al. 2015). Essa redução de açúcares no néctar pode ocasionar a diminuição da atração das formigas, reduzindo a defesa biótica da planta frente aos herbívoros (Chamberlain e Holland 2008, Lange et al. 2013). Como mostrado na espécie de leguminosa *Phaseolus lunatus*, plantas associadas a bactérias do tipo rizóbio secretam menor conteúdo de açúcares no néctar extrafloral, promovendo menor forrageamento de formigas (Godschalx et al. 2015).

Enquanto alguns recursos disponibilizados pelas plantas são ricos em açúcares, como o néctar (Godschalx et al. 2015), outros são ricos em proteínas, como os grãos de pólen (Roulston e Cane 2000). Os grãos de pólen são responsáveis pela proteção e dispersão dos gametas masculinos nas populações de plantas e são constituídos por uma porcentagem variável de proteínas, compostos nitrogenados, aminoácidos, amido e lipídios (Roulston e Cane 2000). Em geral, a concentração de proteínas nos grãos de pólen pode variar de 3-60%, sendo que as espécies com anteras poricidas e polinização por vibração possuem os grãos de pólen mais ricos em proteínas (Roulston e Cane 2000). O pólen é a principal fonte de proteínas e lipídios para as abelhas (Feás et al. 2012), e já se sabe que o tamanho corporal da abelha pode ser determinado pela quantidade de proteína ingerida ao longo do seu desenvolvimento (Roulston e Cane 2000; Quezada-Euán et al. 2010). Devido à quantidade de proteína dos grãos de pólen ser determinante no desenvolvimento corpóreo das abelhas (Roulston e Cane 2000, Quezada-Euán et al. 2010), espera-se que alterações na composição, morfologia e dimensões dos grãos de pólen possam influenciar na quantidade e frequência de visitas realizadas pelas abelhas (Roulston e Cane 2000; Gwata et al. 2003), o que pode gerar consequências relevantes para a polinização e reprodução das plantas. A variação da composição dos grãos de pólen pode ser decorrente de fatores abióticos tais como o clima e o tipo de solo (Feás et al. 2012), mas pouco se sabe sobre o efeito de fatores bióticos, como a nodulação de bactéria do tipo rizóbio, sobre a estrutura, quantidade e qualidade dos grãos de pólen nas plantas (e.g. Gwata et al. 2003).

Dessa maneira, plantas associadas às bactérias do tipo rizóbio poderiam diminuir a produção de compostos à base de açúcares, e em contrapartida aumentar a produção de compostos à base de proteínas e aminoácidos (Fig. 1). Assim, seria esperado o impacto negativo indireto da associação raiz-rizóbio sobre a disponibilização de açúcar no néctar (e.g. Godschalx et al. 2015), e o efeito positivo direto sobre o investimento de proteínas em determinados processos do corpo vegetal, como na produção de grãos de pólen, ou mesmo no aumento da quantidade total de flores ou constância da produção de flores ao longo do tempo. Sendo assim, nesse estudo nós investigamos como se dá o estabelecimento dos diferentes mutualismos ao longo do desenvolvimento de uma espécie de leguminosa do Cerrado, e a possível interferência das bactérias fixadoras de nitrogênio sobre os mutualismos flor-abelha e nectário extrafloral-formiga que se estabelecem na parte aérea dessas plantas.

2. Objetivos, perguntas e hipótese

O objetivo geral deste trabalho foi investigar a relação entre os estádios ontogenéticos de *Chamaecrista desvauxii* var. *latistipula* (Benth.) G.P. Lewis (Leguminosae) e o

estabelecimento de diferentes mutualismos, investigando a possível interferência entre eles ocasionada por modificações na alocação de recursos das plantas. Dessa forma, procuramos responder três perguntas:

(1) Qual é a ordem de estabelecimento das interações mutualistas ao longo da ontogenia da planta? Em outras palavras, como é o padrão de mudança das interações mutualistas raiz-rizóbio, nectário extrafloral-formiga e flor-abelha ao longo do desenvolvimento vegetal?

Hipótese. Espera-se que plantas maiores tenham maior capacidade de alocar recursos para o estabelecimento e manutenção das diversas interações mutualistas. Na ausência do conflito entre mutualismos, plantas maiores irão acumular interações mutualistas, aumentando o número de parceiros e a intensidade das interações com o aumento do tamanho da planta.

(2) Como a interação raiz-rizóbio afeta a produção de néctar dos nectários extraflorais e a produção de flores?

Hipótese: Espera-se que plantas com associação às bactérias do tipo rizóbio secretarão menos néctar com menor conteúdo de açúcares totais. Entretanto, em contraste a hipótese inicial, a associação às bactérias do tipo rizóbio poderia gerar aumento na taxa fotossintética e na produção de fotoassimilados, o que levaria a maior secreção de néctar pelos nectários extraflorais, assim como néctar com maior conteúdo de açúcares totais. Já quanto à produção de flores e grãos de pólen, espera-se que plantas com associação às bactérias do tipo rizóbio produzam mais flores, com maior qualidade/quantidade dos grãos de pólen.

(3) Como a interação raiz-rizóbio afeta indiretamente a interação nectário extrafloral-formiga e a interação flor-abelha? Em outras palavras, como as variações dos recursos da planta se relacionam com a taxa de visitação de formigas e de abelhas nas plantas?

Hipótese: Plantas com menor conteúdo de açúcares totais terão os nectários extraflorais menos forrageados pelas formigas. Enquanto que, plantas produzindo maiores quantidades de flores e/ou flores com maior quantidade de proteínas nos grãos de pólen (e/ou maior quantidade de grãos de pólen *per se*) terão maior a frequência de visitas das abelhas.

3. Material e métodos

3.1. Área de estudo e espécie vegetal

Este estudo foi desenvolvido no município de Botucatu (SP), região que possui clima mesotérmico com estação seca bem definida entre maio e setembro. A precipitação média anual é de 1.430 mm, os meses de maior pluviosidade são dezembro e janeiro e a temperatura média anual é de 20°C (Cunha e Martins 2009). A população de plantas de *C. desvauxii* var. *latistipula* amostrada está localizada em área antropizada no distrito de Rubião Junior próxima à Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Botucatu (22° 53' S 48° 29' O). A área sob estudo possui alta densidade de indivíduos de *Chamaecrista desvauxii* var. *latistipula*, espécie foco do estudo.

Chamaecrista desvauxii var. *latistipula* (Fig. 2) pertence à família Leguminosae e é amplamente distribuída no Brasil, ocorrendo em grande abundância no município de Botucatu/SP e em seu entorno. A espécie é caracterizada por ter hábito arbustivo ou subarbustivo e possui sistema radicular com nódulos, evidenciando associação com as bactérias do tipo rizóbio. A filotaxia das folhas nos ramos é alterna dística, com folhas composta por dois pares de folíolos livres, estípulas persistentes, pedicelos com duas bractéolas inseridas na região mediana ou no ápice dos ramos (Irwin e Barneby 1982). O nectário extrafloral, quando presente, é pequeno e disposto no pecíolo, geralmente no segundo par de folíolos (Irwin e Barneby 1982).

A espécie possui inflorescência do tipo cimosa com 1 a 3 flores pentâmeras assimétricas; com 5 pétalas livres, amarelas, enantioestílicas, sépalas livres; androceu com 10 estames livres, com heteranteria; gineceu formado por um único carpelo; fruto do tipo legume, linear, plano, com duas valvas e deiscência explosiva (Irwin e Barneby 1982). As flores oferecem apenas pólen como recurso floral, possuem anteras com deiscência poricida e os grãos de pólen são liberados apenas quando as abelhas as manipulam por meio de vibrações (*buzz-pollination*) (Buchmann 1983, Gottsberger e Silberbauer-Gottsberger 1988). A antese floral ocorre apenas ao longo das primeiras horas do dia, das 6h30 min às 14h, podendo variar entre populações (Nogueira et al. no prelo).

No mês de janeiro de 2017, todas as plantas da área (de indivíduos jovens – ainda na fase inicial de desenvolvimento, com uma a duas folhas verdadeiras – a indivíduos reprodutivos) foram marcadas e identificadas com placas numeradas. Para a caracterização de cada planta, foram registrados dados de altura (cm), número de folhas, número de cicatrizes foliares, número total de ápices, número de ápices com folhas jovens e presença ou ausência de botões, flores e frutos. Ainda, para compreender como se dá o ciclo reprodutivo e determinar os padrões fenológicos reprodutivos da população amostrada de *C. desvauxii* var. *latistipula*, sorteamos 25 plantas em estágio reprodutivo na mesma área. Foram registrados durante 12 meses o número de ápices com botões, número de flores abertas por planta por dia, número de frutos verdes e número de frutos maduros.

3.2. Delineamento amostral

O projeto foi desenvolvido em duas etapas, uma delas no campo e outra experimental em casa de vegetação.

A etapa de campo utilizou uma população natural de *C. desvauxii* var. *latistipula* e teve o objetivo de descrever como se dá o estabelecimento de mutualismos distintos ao longo do seu desenvolvimento. Sabe-se que a fixação biológica de nitrogênio pelas bactérias do tipo rizóbio pode ser reduzida ou mesmo ausente nas estações mais secas do ano (Sprent 2009), e, por isso, o esta etapa do estudo foi desenvolvida durante o período chuvoso, entre dias não consecutivos nos meses de janeiro e março de 2017 e 2018.

Já o experimento em casa de vegetação foi realizado com plantas cultivadas em vasos a partir de sementes obtidas de plantas-mãe no campo e teve o objetivo de avaliar a influência da interação raiz-rizóbio sob os recursos produzidos pelas plantas para o estabelecimento de outras interações mutualistas e ainda o efeito do solo na interação com as bactérias do tipo rizóbio.

3.3. Descritores do corpo vegetal em plantas de diferentes tamanhos no campo

Dentre as plantas marcadas no campo, foram escolhidas sistematicamente trinta indivíduos incluindo toda a variação de tamanho do corpo vegetal encontrada na população focal, de indivíduos juvenis a maiores reprodutivos. Os descritores mensurados durante essa etapa do projeto relacionados aos mutualismos foram: número de nódulos radiculares, massa seca das raízes, volume e quantidade relativa de açúcares do néctar extrafloral, frequência e número de visitas de formigas aos nectários extraflorais, relação carbono/nitrogênio foliar e raízes, conteúdo de proteínas totais foliar e nas anteras de flores virgens, número de flores produzidas por planta, frequência e número de visitas de abelhas.

3.3.1. Tamanho das plantas, biomassa vegetal e estádios ontogenéticos

O tamanho e a idade da planta podem representar mudanças associadas a alocação de recursos e variações no estabelecimento com os mutualistas entre os estádios ontogenéticos (Barton e Boege 2017). Sendo assim, para representar a variação ontogenética entre os indivíduos da espécie *C. desvauxii* var. *latistipula* encontradas em campo, foram considerados o número de cicatrizes foliares e as folhas persistentes no corpo da planta. As cicatrizes foliares dessa espécie permanecem no corpo vegetal por toda a sua extensão, incluindo as porções mais basais e velhas das plantas. Por isso conseguimos uma medida que representasse toda a parte

aérea do corpo vegetal – inclusive ao longo de todos os seus ramos. Nessa espécie, o número de cicatrizes foliares somada ao número de folhas por planta representam a extensão da parte aérea do corpo vegetal, mesmo quando esta está dividida em diversos fustes e ramos.

Na população amostral, composta por 152 plantas marcadas e numeradas, dividimos os indivíduos em 18 grupos a partir do tamanho da parte aérea das plantas (cicatrizes foliares somada às folhas persistentes). Dentro de cada grupo, sorteamos uma ou duas plantas para esse período de amostragem, a fim de abranger toda a variação de tamanhos da população. As plantas escolhidas variaram de 4 e 1300 unidades de tamanho.

Para a avaliação da biomassa seca total das folhas, caule e raiz das plantas no campo, todas as estruturas foram armazenadas em sacos de papel, identificadas e levadas à estufa a 60°C durante um mês. Neste período, as amostras foram pesadas a em balança de precisão até que a massa seca se estabilizasse e se mantivesse constante.

3.3.2. Medidas de clorofila, proteínas totais e relação C/N foliar

Para a análise da relação C/N, duas folhas medianas totalmente expandidas, sem sinais de herbivoria ou senescência, foram coletadas e secas em estufa a 60 °C por período de uma semana. Em seguida, todas as amostras foram liofilizadas, transferidas para microtubos de 2 ml e trituradas com êmbolos de plástico. A partir do analisador elementar modelo *Flash* EA 1112 foram realizadas medidas de taxas de carbono, nitrogênio, hidrogênio e enxofre por meio da separação de gases.

Para análise de clorofila e carotenoides, de uma a três folhas medianas saudáveis totalmente expandidas foram coletadas e picotadas. As amostras foram identificadas, pesadas e transferidas para tubos plásticos de 15 ml, envoltos por papel alumínio para evitar que houvesse incidência luminosa sobre a amostra. Em seguida, foram adicionados 4 ml de DMSO (dimetilsulfoxido, 99% de pureza) e as amostras foram armazenadas durante aproximadamente cinco dias. Posteriormente, os tubos foram centrifugados e a quantificação de clorofila e carotenoides foi realizada a partir de espectrofotometria nos comprimentos de ondas de 665 nm e 648 nm. Alíquotas das soluções foram transferidas para cubetas de vidro de 3 cm, onde foram feitas as leituras de absorbância (%). Os cálculos de mg/g de clorofila por massa fresco das amostras foliares foram realizados segundo equações de Ronen e Galun (1984) e Barnes et al. (1992).

Por fim, para a extração de proteínas totais foliares, aproximadamente dez folhas medianas saudáveis e totalmente expandidas foram coletadas e congeladas em nitrogênio líquido, ainda em campo. Após esse procedimento, as amostras foram armazenadas a freezer -

80°C. A determinação de proteínas totais foliares ($\mu\text{l/g}$) foi realizada por espectrofotometria de acordo com o método descrito em Bradford (1976). O método de Bradford é uma técnica para a determinação de proteínas totais que utiliza o corante de Coomassie brilliant blue BG-250. A determinação foi realizada em comprimento de onda de 595 nm e a quantificação a partir de curva padrão com albumina de soro bovino (BSA).

3.4. Descritores das plantas associados aos mutualistas

3.4.1. Néctar extrafloral foliar

Para as medidas do néctar extrafloral por folha utilizamos os mesmos ramos escolhidos para observações do padrão de visitas das formigas aos nectários extraflorais. Para medirmos o volume de néctar acumulado ao longo de um dia, todas as folhas do ramo foram ensacadas com sacos plásticos por 24 horas para que não houvesse consumo desse néctar por nenhum inseto. Ainda, como barreira contra formigas e outros possíveis insetos, foi aplicado resina pegajosa (*Tanglefoot*) na base de todos os ramos e ao redor do fechamento dos sacos plásticos. As medidas de néctar extrafloral por ramo por planta foram repetidas três vezes em diferentes dias para que pudéssemos diminuir possíveis efeitos micro ambientais diários.

O volume de néctar por nectário extrafloral foi coletado com a utilização de microcapilares (1 μl de volume). A extensão de cada microcapilar preenchido com néctar foi mensurada com a utilização de paquímetro digital. O néctar dos capilares foi então transferido para refratômetro portátil modelo *low volume* (marca Eclipse) adequado para a quantificação da concentração de açúcares (%) em amostras com volumes reduzidos. A temperatura e umidade relativa do ar também foram registradas. A partir das medidas de volume (μl) e concentração do néctar (% em *Brix*) por nectário extrafloral calculamos o conteúdo total de açúcares no néctar em $\text{mg}/\mu\text{l}$, segundo Galletto e Bernardello (2005).

3.4.2. Produção de flores e quantificação de proteínas totais dos grãos de pólen

Para análise de proteínas totais dos grãos de pólen, todas as plantas da amostragem que estavam em estágio reprodutivo tiveram suas flores ensacadas, a fim de evitar a presença dos visitantes florais, durante duas semanas no mês de março. As flores em antese foram coletadas e congeladas em nitrogênio líquido ainda em campo, e posteriormente armazenadas em laboratório, em freezer -80°C. A determinação de proteínas totais dos grãos de pólen ($\mu\text{l/g}$) foi

realizada assim como as proteínas totais foliares, por espectrofotometria de acordo com o método descrito em Bradford (1976).

3.5. Descritores das interações mutualistas

3.5.1. Descrição das visitas de formigas e abelhas às plantas

O padrão de visitas às flores de *C. desvauxii* var. *latistipula* foi determinado por meio de observações da frequência de visitantes florais. Considerando que a amostragem incluiu indivíduos juvenis a indivíduos maiores reprodutivos, apenas 15 plantas já estavam no estágio reprodutivo produzindo botões florais. Sendo assim, essas plantas foram observadas durante dez dias não consecutivos entre os meses de fevereiro e março em 2017 e 2018, entre 6h30 e 11h30, período este em que as flores desta população permaneciam abertas. As plantas foram observadas durante 30 min por dia, todas as manhãs, alternadamente. Em cada censo por planta registramos o número de flores abertas, número de botões em pré-antese, número de flores visitadas por abelha em 30 min, se o visitante realizava vibrações ou se abria as anteras com a mandíbula para a obtenção dos grãos de pólen, número de vibrações por visita (quando o visitante era capaz de vibrar as anteras) e grupo funcional ao qual o visitante pertencia – polinizador ou antagonista. Por fim, foi possível calcular a abundância de abelhas em 10 horas, número de flores produzidas por planta e à frequência de flores por planta em 10 dias. A frequência de produção de flores por planta foi calculada pela razão entre o número de dias que as plantas produziram flores e o total de dias de amostragem.

Para determinar o padrão de visita das formigas ao nectário extrafloral, as dez primeiras folhas a partir do ápice de um ramo foram selecionadas em dezenove plantas no campo e estas foram observadas durante 15 dias não consecutivos entre os meses de fevereiro e maio de 2017. Dado que alguns grupos de formigas evitam os horários de alta insolação e temperatura em ambientes mais abertos (Del-Claro e Oliveira 2000) nós amostramos as formigas no período das 8h às 10h30 e das 15h30 às 18h30. Cada planta foi observada no intervalo de 30 min, divididos em 5 min iniciais para observação geral da planta e contagem total das formigas distribuídas pela planta, independente se esta visitava o nectário ou não. Essa contagem teve a finalidade de registrar o número de formigas que forrageavam sobre o corpo da planta, não apenas o ramo escolhido para a amostragem. Em seguida, 15 min foram destinados para observações focais dos nectários extraflorais das dez folhas do ramo marcado inicialmente. Neste ramo realizamos o censo de toda formiga que tocava o nectário extrafloral. Após este período, novamente, 5 min foram destinados à contagem total das formigas distribuídas por

toda a planta. Por último, durante os cinco minutos finais, todas as formigas das plantas foram coletadas e fixadas em álcool 70%. Por fim, foi possível calcular número de formigas por planta e por ramo em 15 dias e o conteúdo de açúcares totais do néctar extrafloral.

3.5.2. Contagem de nódulos radiculares

Após a amostragem dos descritores da planta e das interações estabelecidas na parte aérea em campo, dezenove plantas foram escavadas e levadas ao laboratório para análise do sistema radicular. Para manter o máximo de precisão, nós optamos por coletar um bloco de terra intacto contendo as raízes de cada planta no campo, e processar o material posteriormente em laboratório. Para cada planta as raízes foram amostradas a uma distância de 30 cm a partir da base do caule, formando uma circunferência ao redor da planta focal com 40 cm de profundidade. Para plantas com altura maior que 1 M fizemos sub-amostras de solo em mais 20 cm para além dos 30 cm de distância da base do caule. Para todas as plantas inspecionamos o solo abaixo dos 40 cm de profundidade, para verificarmos se ainda existia evidências de raízes de *C. desvauxii* var. *latistipula* para além dessa profundidade.

Para assegurar que todas as raízes na área escavada seriam amostradas, o bloco de terra das plantas foi disposto em sacos plásticos, embalado e transportado ao laboratório. Posteriormente todos os blocos de terra foram distribuídos em peneiras finas e lavados com água abundante para a retirada gradual do solo, a fim de manter intacto o quanto possível o sistema radicular, incluindo as raízes mais finas e os nódulos. Todas as partes da raiz tiveram o número de nódulos contados. Por fim, foi possível calcular a biomassa total da raiz e o número de nódulos radiculares por planta.

3.6. Etapa experimental em casa de vegetação: manipulando às bactérias do tipo rizóbio

Para compreender as respostas das plantas e a influência da interação raiz-rizóbio na produção dos recursos vegetais mediando outras interações mutualistas que se sucedem sobre as plantas de *C. desvauxii* var. *latistipula*, foi realizado o experimento em casa de vegetação no qual manipulamos a presença das bactérias do tipo rizóbio no sistema radicular (Fig. 3). Dessa forma, cultivamos plantas em situações extremas de ausência e presença da interação raiz-rizóbio. Nesta etapa, todos os outros fatores bióticos e abióticos foram controlados dentro da casa de vegetação, em especial a umidade e o pH neutro do solo. Inicialmente foram coletados frutos de 10 plantas-mãe marcadas na mesma área onde foi desenvolvido o experimento de campo (22° 53' S 48° 29' O). Em setembro de 2017, foram selecionados de 2 a 4 frutos

maduros, próximos da sua deiscência, de cada planta-mãe para a obtenção de sementes. Para coleta dos frutos foram escolhidos aqueles totalmente desenvolvidos, secos e com coloração escura, sem danos e com grande quantidade de sementes saudáveis.

Dado que a interação raiz-rizóbio é variável de acordo com as condições edáficas e disponibilidade de nitrogênio inorgânico no solo (Weese et al. 2015), estabelecemos o experimento fatorial 2x2 em que manipulamos as bactérias do tipo rizóbio e as condições edáficas do solo. Todo o substrato utilizado para o experimento foi inicialmente esterilizado em autoclave (situação com ausência de bactérias), e metade dos vasos foram subsequentemente inoculados com macerado de nódulos bacterianos em solução de água destilada (situação com presença de bactérias). Para o solo, criamos duas condições edáficas. Um solo era composto majoritariamente por areia (90 % de areia com 10% de terra vegetal misturada), com baixa concentração de nutrientes, e em especial de nitrogênio (0.5 g de N para 1.000 g de solo). O outro solo era composto por terra vegetal rica em matéria orgânica (5.05 g de N para 1.000 g de solo). Para esse solo composto por terra vegetal adicionamos 100 ml de solução tampão de nitrato de potássio (KNO₃ 2M) por vaso após 45 dias do plantio das sementes (situação com solo rico em matéria orgânica e nitrogênio; chamado a partir de agora de solo MO). Dessa forma, o experimento contou com quatro condições distintas no qual manipulamos a presença das bactérias do tipo rizóbio e o tipo de solo no qual as sementes de *C. desvauxii* var. *latistipula* foram semeadas, totalizando quatro tratamentos: areia com rizóbio, areia sem rizóbio, solo rico em matéria orgânica com rizóbio e solo rico em matéria orgânica sem rizóbio.

Para o plantio das sementes foram selecionados 60 vasos de 30 L, que foram devidamente esterilizados com álcool 70%, água sanitária e água oxigenada, a fim de evitar que houvesse qualquer tipo de contaminação bacteriana no estabelecimento do experimento e posteriormente à germinação. Todas as sementes foram escarificadas mecanicamente antes de serem plantadas para eliminar a dormência primária, e também esterilizadas com álcool 70%, água sanitária e água oxigenada (Somasegaran e Hoben 1994). Por fim, foram distribuídas quatro sementes em todos os vasos. Para o tratamento com rizóbio, as plantas receberam em dois momentos – uma e duas semanas após o plantio das sementes – solução de nódulos radiculares frescos triturados e imersos em 1 L de água provenientes de três plantas distintas.

Assim como as plantas do campo, todas as plantas do experimento foram avaliadas quanto aos descritores do desenvolvimento e dos recursos associados ao mutualismo da formiga. Para as medidas do néctar extrafloral por planta, todas as folhas foram ensacadas com sacos plásticos para que o néctar acumulasse durante 24 horas. O volume (µl), concentração (%) e o conteúdo total de açúcares do néctar (mg/µl) por nectário extrafloral foram mensurados com a mesma metodologia utilizada para as plantas em campo. Para descrever o

desenvolvimento do corpo vegetal e a assimilação de nitrogênio foi realizado amostragens de altura (cm), número de folhas, número de cicatrizes, tamanho da folha maior (cm) e número de ramificações por planta. Para as análises da relação C/N, uma folha mais jovem totalmente expandida por planta foi coletada (em geral terceiro ou quarto nó a partir do ápice do ramo), macerada em nitrogênio líquido e em seguida liofilizada. A partir do analisador elementar, assim como para as plantas em campo, foi realizado as medidas da relação C/N.

3.7. Análises estatísticas

Dado que utilizamos a variável tamanho da planta (número de cicatrizes das folhas somadas às folhas persistentes) para descrever as plantas e associá-las aos seus estádios ontogenéticos, inicialmente nós modelamos essa variável em relação à biomassa seca das plantas, à biomassa seca do caule e à biomassa seca da raiz. Para isso, utilizamos o modelo linear geral (LM) com distribuição probabilística gaussiana.

De acordo com a nossa primeira pergunta, testamos a relação entre a ocorrência dos mutualismos e o tamanho das plantas. Para isso, utilizamos o modelo linear generalizado (GLM) com distribuição probabilística binomial, no qual as variáveis dependentes foram a ocorrência dos nódulos radiculares (presença ou ausência), a ocorrência de formigas (presença ou ausência) e a ocorrência de abelhas (presença ou ausência), e a variável independente foi o tamanho da planta. De forma complementar, nós testamos a relação entre a intensidade dos mutualismos e o tamanho das plantas utilizando o modelo linear generalizado (GLM) com distribuição probabilística de Poisson ou binomial negativa. Nestes casos, as variáveis dependentes foram número de nódulos radiculares (contagem), número de formigas (contagem) e número de abelhas (contagem), e a variável independente foi o tamanho da planta.

De acordo com a segunda pergunta, testamos a relação entre o número de nódulos radiculares (intensidade da interação raiz-rizóbio) e os recursos da planta disponíveis para outras interações mutualistas. Dado que as plantas no campo variavam em tamanho e esse aspecto determina parte da variação de seus recursos, nós utilizamos um procedimento estatístico para minimizar esse problema, extraindo os resíduos das variáveis originais pelo tamanho das plantas em modelos lineares simples. Utilizamos transformação logarítmica das variáveis originais antes da extração dos resíduos. Esse procedimento foi aplicado sobre as duas variáveis dependentes, açúcar total dos nectários no ramo focal e o número de flores por planta, quanto também sobre a variável independente, número de nódulos radiculares. Após esse procedimento, utilizamos os resíduos dessas variáveis (agora sem o efeito de tamanho) para os testes de hipótese em modelos lineares gerais (LM) com distribuição probabilística gaussiana.

De acordo com a terceira pergunta, testamos a relação entre os diferentes recursos da planta e as interações mutualistas com formigas e abelhas. Para isso, utilizamos três modelos lineares generalizados (GLM) distintos com distribuições probabilísticas binomiais negativa. Primeiramente, testamos a relação entre a variável dependente número de formigas por ramo focal (contagem) e a quantidade de açúcar total dos nectários. Também testamos a relação entre a variável dependente número de abelhas por planta (contagem) e o número de flores produzidas por planta. Subsequentemente, testamos a relação entre a variável dependente número de abelhas (contagem) e a frequência de produção de flores ao longo do tempo.

Na etapa experimental testamos se a inoculação de bactérias do tipo rizóbio e o tipo de solo afetam os descritores do corpo vegetal (altura, taxa de crescimento e número de folhas das plantas), assim como os recursos das plantas disponíveis a outros mutualistas (volume e conteúdo de açúcar total do néctar). Para isso, utilizamos a análise de variância fatorial com dois fatores, que testa o efeito aditivo e multiplicativo de vários fatores sobre uma variável resposta de interesse, com distribuição probabilística gaussiana. Os fatores fixos em todas as análises foram a inoculação do rizóbio (variável categórica com dois níveis: presença ou ausência das bactérias), o tipo de solo (variável categórica com dois níveis: solo MO e solo arenoso) e o fator de interação entre ambos. Adicionalmente, para testar a diferença par a par de todas as quatro condições experimentais (plantas em solo arenoso com rizóbio, plantas em solo arenoso sem rizóbio, plantas em solo MO com rizóbio, plantas em solo MO sem rizóbio), nós aplicamos uma análise de variância um fator, no qual o fator fixo teve os quatro níveis descritos acima. Em seguida, utilizamos o teste a posteriori de Tukey para testar as diferenças dos descritores vegetais e dos recursos produzidos pelas plantas entre os quatro níveis do experimento.

Em todas as análises estatísticas consideramos os pressupostos (e.g. normalidade das variáveis originais e dos resíduos e homogeneidade de variâncias), assim como a sobredispersão dos resíduos no caso dos modelos generalizados (do inglês “*overdispersion*”). Análises gráficas visuais dos resíduos também foram utilizadas como ferramenta exploratória e de avaliação dos pressupostos de cada análise. Para a realização de todas as análises estatísticas e confecção dos gráficos foi utilizado o programa R versão 3.4.3 (R Development Core Team 2018) e o pacote adicional glmmADMB (Bolker et al. 2012).

4. Resultados

4.1. Variação do tamanho das plantas de *Chamaecrista desvauxii* var. *latistipula* e estabelecimento das interações mutualistas

A população amostrada floresceu durante quase todo o ano, com pico de floração entre os meses de novembro e dezembro (Fig. 4). As plantas amostradas no campo tiveram o tamanho da parte aérea variando de 4 a 1300 unidades, quando consideramos a soma do número de cicatrizes foliares e o número de folhas por planta. Plantas maiores tiveram biomassa total maior, incluindo a do caule e raiz (Fig. 5). Em média, os níveis de clorofila estiveram mais altos em plantas em estágio reprodutivo (Tabela 1). Já a relação C/N, foliar e raiz, e a quantidade de proteínas solúveis totais na folha foi semelhante entre os dois grupos de plantas (Tabela 1), assim como a produção e conteúdo total de açúcares do néctar (Tabela 1). Já a quantidade de proteínas solúveis totais dos grãos de pólen só foi possível avaliar nas plantas reprodutivas (Tabela 1).

Os três mutualismos se estabeleceram em *C. desvauxii* var. *latistipula* em momentos distintos da vida das plantas, em diferentes tamanhos (Fig. 6). Enquanto que a interação raiz-rizóbio e nectário extrafloral-formiga se estabeleceu a partir de plantas muito pequenas, variando de 2 a 4 unidades de tamanho (Fig. 6A–B), a interação entre abelhas e flores se estabeleceu em plantas relativamente maiores, com mais de 50 unidades de tamanho (Fig. 6C). Dado que plântulas e plantas juvenis até 10 unidades de tamanho geralmente não possuem nectários extraflorais nas primeiras folhas verdadeiras produzidas, e investem mais recursos inicialmente no sistema radicular do que na parte aérea, o estabelecimento de nódulos no sistema radicular são os primeiros mutualistas a serem estabelecidos ao longo de desenvolvimento de *C. desvauxii* var. *latistipula*.

O número de nódulos radiculares aumentou exponencialmente com o aumento do tamanho da planta, atingindo mais de 300 nódulos em plantas com 700 ou mais unidades de tamanho (Fig. 7A). No sistema radicular de *C. desvauxii* var. *latistipula* o número de nódulos bacterianos variou de 4 a 440 entre plantas (Tabela 2). Já o número total de formigas forrageando sobre a planta seguiu modelo de distribuição quadrática, no qual plantas intermediárias de 300 a 400 unidades de tamanho tiveram a maior abundância de formigas quando comparadas com plantas muito pequenas ou muito grandes (Fig. 7B). Quando amostramos a abundância de formigas visitando ativamente os nectários extraflorais em um ramo focal dentro de cada planta, a maior abundância de formigas foi observada em plantas pequenas de 1 a 100 unidades de tamanho (Tabela 2), no qual plantas menores tiveram de quatro a cinco vezes mais visitação do que plantas maiores (Fig. 7C). Aproximadamente cinco morfoespécies de formigas foram encontradas forrageando os nectários de *C. desvauxii* var. *latistipula* na área de estudo. As formigas forrageando os nectários eram geralmente pequenas e com comprimento variando entre 3 e 10 mm. O pico de visitas das formigas nos nectários extraflorais

foi entre 08h30 e 10h, 32% do total de visitas registradas, e entre 18h e 18h30, aproximadamente 35% do total de visitas.

Finalmente, o número de abelhas visitando as flores (Tabela 2) aumentou exponencialmente com o aumento do tamanho da planta, no qual plantas maiores tiveram de quatro a cinco vezes mais visitas que plantas pequenas reprodutivas (Fig. 7D). Plantas reprodutivas tiveram grande variação na produção de flores dependendo do seu tamanho, produzindo de uma a dez flores em antese por dia. A maioria das flores abriu no período entre 6h30 e 7h, coincidentemente o pico de visitação das abelhas, em que cerca de 35% das visitas foram registradas. Foram observadas cinco morfoespécies de abelhas visitando as flores de *C. desvauxii* var. *latistipula*. O visitante mais comum foi *Bombus* sp. com 79% das visitas (Tabela 3). Durante a vibração das anteras, *Bombus* sp. mordida a base das anteras longas com suas mandíbulas enquanto vibrava o conjunto de anteras e ficava com o corpo coberto por grãos de pólen, em geral tocando o estigma durante as vibrações, o que a torna o visitante legítimo mais frequente da população de *C. desvauxii* var. *latistipula*. As visitas das outras morfoespécies corresponderam a menos de 25% do total (Tabela 3). *Melipona* sp. e *Apis mellifera* (cerca de 10% das visitas) provavelmente exploravam os grãos de pólen dispersos na pétala maior das flores (cuculus), após a visita de abelhas que vibravam as anteras, especialmente de *Bombus* sp. As morfoespécies *Megalopta* sp. e *Oxaea* sp. também vibravam as anteras e tocavam o estigma durante as vibrações, porém suas visitas foram esporádicas durante o estudo.

4.2. Efeito da interação mutualista raiz-rizóbio, produção de néctar extrafloral e flores

Os resultados obtidos no campo não evidenciaram relação entre a nodulação no sistema radicular e a produção dos recursos das plantas. No entanto, o tamanho da planta esteve correlacionado com a nodulação (ver figura 7A), o que inviabilizou a investigação dos mecanismos por detrás dos padrões associados ao estabelecimento das interações raiz-rizóbio no campo.

Já no experimento em casa de vegetação observamos que a interação raiz-rizóbio influenciou o padrão de desenvolvimento do corpo vegetal, assim como a produção de recursos vegetais, mais especificamente, a secreção de néctar pelos nectários extraflorais das folhas. Em média, plantas com rizóbio são maiores em altura (39,7 cm \pm 22,1) (média \pm desvio padrão) e produziram mais folhas (19,2 folhas \pm 11,5) do que as plantas sem rizóbio (19,6 cm \pm 8,3 e 11,3 folhas \pm 3,4, respectivamente). Porém, o efeito positivo da presença do rizóbio sobre as plantas foi variável dependendo do tipo de solo em que as plantas foram cultivadas (Fig. 8). Em solo com areia, as plantas com rizóbio tiveram a maior taxa de crescimento, atingindo a maior altura

(53,6 cm \pm 16,1) (Fig. 8A) e número de folhas (25,5 folhas \pm 11) do que qualquer outra condição experimental. Enquanto que no solo com areia sem rizóbio as plantas tiveram as menores alturas (15,94 cm \pm 5,95) (Fig. 8B), produziram menos folhas (9,7 folhas \pm 2,6), e tiveram a menor taxa de crescimento (1,7 cm/dia \pm 1,4). Já em solo MO, plantas com e sem rizóbio tiveram alturas semelhantes (20,5 cm \pm 12,4 e 23,2 cm \pm 8,8, respectivamente), produziram número semelhante de folhas (11,2 folhas \pm 5,8; 12,9 folhas \pm 3,3, respectivamente), assim como a taxa de crescimento (16,7 cm/dia \pm 11,9 e 19,5 cm/dia \pm 7,8, respectivamente).

Na produção do néctar, plantas com rizóbio secretaram maiores volumes de néctar nos nectários das folhas do que plantas sem rizóbio (0,33 μ l \pm 0,5 e 0,05 μ l \pm 0,09, respectivamente). O mesmo foi observado com o conteúdo total de açúcares do néctar, no qual plantas com rizóbio secretaram néctar com o conteúdo total de açúcares maior que plantas sem rizóbio (0,07 mg/ μ l \pm 0,09 e 0,02 mg/ μ l \pm 0,07, respectivamente). Entretanto, os efeitos da presença do rizóbio também foi variável de acordo com o tipo de solo que as plantas foram cultivadas (Fig. 9), enquanto plantas em areia com rizóbio produziram maior volume de néctar (0,36 μ l \pm 0,47) do que plantas em areia sem rizóbio, que não produziram néctar extrafloral em nenhuma de suas plantas; em solo MO a produção de néctar foi semelhante tanto no volume (0,29 μ l \pm 0,51 e 0,10 μ l \pm 0,11, respectivamente) (Fig. 9A) quanto no conteúdo total de açúcares (0,05 mg/ μ l \pm 0,07; 0,04 mg/ μ l \pm 0,05, respectivamente) (Fig. 9B).

4.3. Recursos das plantas associados aos mutualistas

Quando analisado o néctar extrafloral dos ramos das plantas controlado para a variação do tamanho das plantas com plantas do campo, não detectamos relação entre a variação do néctar disponibilizado pela planta e a taxa de visitação de formigas (Fig. 10A). Já as plantas que produziram menos flores foram menos visitadas por abelhas do que aquelas que produziram mais flores (Fig. 10B). De forma semelhante, plantas que floresceram em menor frequência e tiveram padrão mais irregular de floração ao longo do tempo foram menos visitadas pelas abelhas (Fig. 10C). Os dados com as plantas da etapa experimental ainda estão em andamento.

5. Discussão

Os resultados obtidos neste estudo nos permitiram, pela primeira vez, descrever como se dá o estabelecimento de três mutualismos distintos (Fig. 11) ao longo do desenvolvimento de uma espécie de leguminosa, *Chamaecrista desvauxii* var. *latistipula*, e investigar possíveis interferências entre tais mutualismos. Em especial, avaliamos o efeito do mutualismo

estabelecido no sistema radicular, sobre os mutualismos de polinização e de proteção, que se estabelecem subsequentemente na parte aérea do corpo vegetal. Foi possível observar que a interação raiz-rizóbio e nectário extrafloral-formiga se estabelecem em plantas ainda muito pequenas. Enquanto a interação raiz-rizóbio aumenta ao longo do desenvolvimento das plantas, a interação nectário extrafloral-formiga atinge seu pico de plantas pequenas a intermediárias, e decresce em plantas maiores. Quando manipulamos as bactérias do tipo rizóbio no experimento em casa de vegetação, foi possível observar que plantas com rizóbio são maiores, crescem mais rapidamente e produzem mais folhas do que plantas sem rizóbio, mas esse resultado foi variável de acordo com o tipo de solo em que as plantas foram cultivadas. Plantas em solo MO, independente da inoculação das bactérias, tiveram tamanhos e taxas de crescimento semelhantes, o que sugere possível ausência da nodulação no sistema radicular nessas plantas. Além disso, plantas com rizóbio produziram mais néctar com maior conteúdo total de açúcares, mas esse efeito não foi consistente entre os tipos de solo. Interessantemente, plantas em areia sem rizóbio não produziram néctar, e as demais condições experimentais tiveram volumes e conteúdo de açúcar totais semelhantes, embora em média as plantas sejam muito distintas em tamanho. Isso sugere que plantas crescendo em solos ricos em nitrogênio disponível, possam ser mais eficientes na produção de néctar, embora cresçam mais lentamente. Se de fato, plantas em solo MO têm taxa de infecção bacteriana baixa ou inexistente, isso poderia explicar a semelhança entre os dois tratamentos, com e sem rizóbio, nos diversos descritores vegetais e de recursos da planta. Abaixo procuramos discutir esses padrões e possíveis mecanismos de acordo com a literatura pertinente.

5.1. Estabelecimento das interações mutualistas ao longo da ontogenia das plantas

À medida que as plantas se desenvolvem e crescem, passam por uma série de estádios de desenvolvimento previsíveis e reconhecíveis (Elger et al. 2009). Durante este desenvolvimento, denominado ontogenia, as plantas germinam no estádio da semente, passam pelo estádio juvenil vegetativo, tornam-se maduras no início da reprodução e terminam na senescência (Barton e Boege 2017). O estabelecimento e intensidade das interações mutualistas sobre as espécies vegetais variam ao longo da ontogenia da planta (Ochoa-Lopez et al. 2015), e esse padrão pode ser compreendido pelas restrições de alocação de recursos e mudanças nos custos e benefícios de tais interações durante o desenvolvimento vegetal (Barton e Boege 2007). Em nosso estudo, os três mutualismos focais se estabelecem sequencialmente sobre as plantas de *C. desvauxii* var. *latistipula*, iniciando com as bactérias do tipo rizóbio, seguidos rapidamente pela chegada das formigas após a formação das primeiras folhas com nectários

extraflorais, e por fim, mais tardiamente, com a presença das abelhas com o desenvolvimento dos primeiros botões florais.

Nossos resultados evidenciaram que a primeira interação mutualista estabelecida foi com as bactérias do tipo rizóbio nas fases ontogenéticas iniciais, justamente o mutualismo tido como mais custoso dentre os demais (Wall e Moore 1999). Esse padrão sugere que o custo de tal interação, que pode consumir quantidade razoável dos fotoassimilados produzidos pela planta, seja compensado pelo nitrogênio disponibilizado pelas bactérias já em fases tenras da plântula e plantas juvenis, alterando desde o início os recursos utilizados pela planta para seu crescimento e desenvolvimento (Wall e Moore 1999). Diversos trabalhos sugerem que a assimilação e alocação de recursos em estádios iniciais da ontogenia seja limitante e que aumentem em estádio mais avançados (Boege e Marquis 2005). Verificamos que plantas maiores de *C. desvauxii* var. *latistipula* tiveram mais nódulos radiculares nas raízes. Independente da interação com as bactérias, plantas maiores têm maior capacidade fotossintética, pois possuem maior área foliar (Barton e Boege 2007). Neste caso, os fotoassimilados produzidos podem ser direcionados para o crescimento das raízes (Lambers 1987), aumentando a biomassa radicular e a formação de raízes finas que poderiam permitir o aumento exponencial da nodulação bacteriana, como o observado em nosso estudo.

Em *C. desvauxii* var. *latistipula*, a interação nectário extrafloral-formiga também se estabeleceu em plantas pequenas, evidenciando o papel crucial de tais interações na defesa biótica em estádios iniciais da ontogenia, como observado em outros sistemas tropicais (e.g. Ochoa-Lopez et al. 2015). Sabe-se que as formigas desempenham papel crucial na defesa biótica das plantas por atacarem e muitas vezes se alimentarem de herbívoros (McLain 1983, Ness et al. 2009), e isso pode ser ainda mais crucial nos primeiros estádios de desenvolvimento das plantas de *C. desvauxii* var. *latistipula*. Rhoades e Cates (1976) sugeriram que os estádios ontogenéticos iniciais devem ser altamente defendidos devido à sua maior susceptibilidade ao ataque de herbívoros, o que pode explicar a maior frequência de formigas potencialmente defensoras visitando os nectários extraflorais em plantas pequenas do nosso estudo. Diversos estudos mostraram que o forrageamento de formigas nos nectários extraflorais pode aumentar com os estádios ontogenéticos decorrente à maior capacidade de plantas maiores em alocar recursos e investir na defesa biótica (Bronstein 1994, Miller 2007, Villamil et al. 2013, Koch et al. 2015). Em contraste, outros trabalhos sugerem que as defesas indiretas das plantas podem diminuir com o seu desenvolvimento (Doak et al. 2007, Wooley et al. 2007, Quintero et al. 2013;), pois propõe-se que as formigas não conferem proteção suficiente em plantas maiores quanto para plantas menores (Doak et al. 2007). Ainda, sabe-se que plantas menores ou mais jovens têm taxa de mortalidade maior nos sistemas tropicais quando comparadas a plantas

maiores (Del-Val e Crawley 2005), o que explicaria a maior abundância de formigas em plantas menores. No entanto, além da defesa biótica exercida pelas formigas, existem alternativas, como as defesas químicas, e é possível que plantas maiores tenham arsenal de defesa distinto do disponível em plantas jovens em uma mesma espécie (Del-Val e Crawley 2005) ou sejam mais tolerantes ao ataque de herbívoros (Stout et al. 2002). Como mostrado pelo nosso trabalho, em que o maior número de formigas visitando ativamente os nectários extraflorais foi de fato em plantas pequenas a intermediárias, diminuindo consideravelmente em plantas maiores.

Como o esperado, a interação flor-abelha apareceu apenas nos estádios intermediários e tardios, já que são dependentes do aparecimento dos primeiros botões florais. Do ponto de vista da polinização, sabe-se que plantas maiores em geral possuem maior anúncio floral, atraindo maior quantidade de visitantes florais (Klinkhamer et al. 1989). Neste caso, tanto o tamanho das plantas quanto a produção de flores podem afetar o comportamento do polinizador (Schmitt 1983), aumentando a frequência de visitantes florais quando há maiores quantidades de flores produzidas pelas plantas. Como o esperado, o mesmo pôde ser observado no nosso trabalho, no qual plantas maiores de *C. desvauxii* var. *latistipula* que produzirão maior quantidade de flores foram mais visitadas pelas abelhas.

É perceptível que plantas maiores possuam mais recursos e provavelmente mais demandas conflitantes relacionadas às diversas funções no corpo da planta, como por exemplo na defesa (Ochoa-Lopez et al. 2015), o que pode explicar as mudanças na intensidade das interações mutualistas ao longo do desenvolvimento das plantas. Conhecer a sequência de estabelecimento dos mutualismos é um aspecto fundamental para se compreender os potenciais custos relativos do conjunto de interações em um sistema (Pringle 2015), e nos permite conjecturar sobre quais estádios os benefícios de tais interações são suficientes para superar os seus custos, separadas ou em conjunto. Dado que em nosso estudo, as plantas sob condições naturais do campo tiveram relação positiva na nodulação bacteriana e na visita das abelhas com o tamanho das plantas, mas relação quadrática e/ou negativa com a visita das formigas, esse padrão conjunto sugere o possível impacto negativo da interação raiz-rizóbio sobre a interação nectário-formiga em *C. desvauxii* var. *latistipula*. Dessa forma, o aumento da nodulação bacteriana no sistema radicular ao longo da ontogenia das plantas poderia modificar a alocação de recursos à base de carboidratos direcionando-os para o sistema radicular, diminuindo sua disponibilidade para outras funções vegetais, como a defesa biótica (Godschalx et al. 2015). De forma complementar, o padrão conjunto dos mutualismos sobre as plantas de *C. desvauxii* var. *latistipula* não descarta a hipótese de que a nodulação favoreça a visita das abelhas. Em ambos os casos, a interação raiz-rizóbio poderia ser invocada como causa primeira de mudanças

fenotípicas na alocação de recursos das plantas, causando mudanças indiretas no estabelecimento e manutenção das demais interações mutualistas.

5.2. Efeito da interação mutualista raiz-rizóbio sobre a produção de néctar extrafloral e visitas de formigas

Segundo Godschalx et al. (2015), é esperado que a interação raiz-rizóbio interfira negativamente no conteúdo de açúcar do néctar secretado pelos nectários extraflorais das folhas, e por consequência, diminua a visita de formigas sobre as plantas. Isso pode ser explicado pela alta quantidade de fotoassimilados necessária para manter o mutualismo raiz-rizóbio (Dilworth et al. 2008), o que pode levar à diminuição de investimento em compostos à base de carboidratos para outras funções da planta (Godschalx et al. 2015). Em contraste, ao tornar o nitrogênio acessível à planta, as bactérias do tipo rizóbio podem aumentar a disponibilidade de recursos à base de carboidratos pelo aumento da taxa fotossintética, o que poderia ser revertido para as diversas funções vegetais (Wall e Moore 1999), inclusive para a produção de néctar extrafloral associado a defesa biótica. Desta forma, uma hipótese alternativa para o impacto das bactérias do tipo rizóbio seria o aumento da disponibilidade de carboidratos como um todo, e consequentemente, um aumento do conteúdo de açúcar do néctar, intensificando a visita de formigas protetoras nos nectários extraflorais das plantas. Esse padrão foi observado por Keller et al. (2018), no qual plantas associadas às bactérias do tipo rizóbio foram mais forrageadas pelas formigas do que plantas sem a interação raiz-rizóbio. Entretanto, em nosso estudo, o volume e o conteúdo de açúcares secretado pelos nectários extraflorais das plantas no campo não estiveram relacionados com o número de nódulos radiculares (quando controlado para o tamanho da planta). Isso pode ser explicado pelos procedimentos de seleção das plantas focais, que privilegiou a variação de tamanho entre plantas, e por não ter sido possível encontrar no campo indivíduos sem a presença da interação raiz-rizóbio. Em nossa amostragem, todas as plantas tiveram nódulos no sistema radicular embora com grande variação quantitativa entre os indivíduos.

Já no experimento em casa de vegetação, plantas inoculadas com bactérias do tipo rizóbio tiveram maior volume de néctar secretado, assim como maior conteúdo total de açúcar, quando comparadas com plantas sem rizóbio; embora esse efeito tenha sido variável de acordo com o tipo de solo que as plantas foram cultivadas. De forma surpreendente, a produção de néctar total por planta foi muito semelhante entre grupos de plantas com tamanhos muito distintos (plantas em solo MO e plantas em areia com rizóbio). Esse padrão sugere que plantas em solo rico em matéria orgânica (solo MO), independente da presença de rizóbio, foram mais

eficientes na produção de néctar, embora tenham taxa de crescimento da parte aérea mais lenta e metade do tamanho das plantas em areia com rizóbio. Quanto ao efeito da interação raiz-rizóbio no desenvolvimento vegetal, estudos mostraram que plantas cultivadas em solos com presença de bactérias do tipo rizóbio no sistema radicular eram maiores, assim como produziram mais folhas (Clarholm 1985, Ingham et al. 1985, Wall e Moore 1999). Ainda, a inoculação dessas bactérias em algumas leguminosas, além de induzir o aumento do tamanho das plantas, também provocou alterações químicas, com plantas que produziram folhas mais ricas em compostos nitrogenados (Dean et al. 2009). Todos esses resultados podem ajudar a explicar a maior taxa de crescimento e produção de folhas nos indivíduos inoculados com bactérias do tipo rizóbio de *C. desvauxii* var. *latistipula* em nosso experimento em casa de vegetação.

Há evidências de que as plantas diminuem os recursos direcionados para as bactérias no sistema radicular quando não existe limitação de nitrogênio no solo, resultando na diminuição da nodulação, produção de nódulos menores e conseqüentemente reduzindo a eficiência do mutualismo raiz-rizóbio (Frederickson 2013, Weese et al. 2015, Grillo et al. 2016). Nesses casos, plantas com bactérias do tipo rizóbio no sistema radicular em solos com baixas concentrações de nitrogênio crescem mais quando comparadas às plantas com interação raiz-rizóbio em solo com altas concentrações de nitrogênio (e.g. Weese et al. 2015). Esse efeito descrito na literatura poderia explicar a variação no efeito da inoculação das bactérias do tipo rizóbio em plantas de *C. desvauxii* var. *latistipula*, cultivadas sob diferentes tipos de solo. Plantas cultivadas em solo com baixas concentrações de nitrogênio (areia) e inoculadas com rizóbio cresceram mais quando comparadas às plantas em solo com altas concentrações de nitrogênio (solo MO) com rizóbio. Quando o nitrogênio disponível no solo não é fator limitante, torna-se menos custoso para a planta adquiri-lo diretamente do solo, ao invés de investir recursos provenientes da fotossíntese para a manutenção do mutualismo com as bactérias do tipo rizóbio e/ou no processo de fixação do nitrogênio gasoso (Grillo et al. 2016). As leguminosas normalmente diminuem a nodulação em solos com altas concentrações de nitrogênio (Streeter 1988, Gyan'ko et al., 2009), o que reforça o alto custo dessa interação para a planta (Grillo et al. 2016).

O néctar dos nectários extraflorais é composto essencialmente de açúcares provenientes da fotossíntese (Godschalx et al., 2015). Este recurso é importante na atração de formigas que podem atuar na proteção das plantas frente aos herbívoros (Rico-Gray e Oliveira 2007, Nascimento e Del-Claro 2009). A maioria das formigas prefere o néctar concentrado e rico em carboidratos (Galletto e Bernardello 1992) e sabe-se que o aumento do conteúdo de açúcar do néctar em geral aumenta a atração das formigas (Chamberlain e Holland 2008, Lange et al.

2013). Por consequência, a secreção de néctar rico em carboidratos pode aumentar o forrageamento das formigas, e ainda, a eficácia da defesa mediada pelas formigas (Davidson 1998, Ness et al. 2009, Byk e Del-Claro 2011). Em nossos resultados no campo, os descritores do néctar extrafloral das plantas não estiveram relacionados com a visitação de formigas, e parte desse resultado pode ser devido a existência de outras fontes de variação influenciando a secreção dos nectários extraflorais, além da dificuldade de obtenção de amostras adequadas de néctar com volumes muito reduzidos sob condições de campo.

5.3. Efeito da interação mutualista raiz-rizóbio sobre a produção de flores e visitas de abelhas

O aumento da disponibilidade de nitrogênio como resultado da interação raiz-rizóbio (Wall e Moore 1999) poderia explicar as diferenças encontradas nos indivíduos de *C. desvauxii* var. *latistipula* no campo quanto a produção de flores em plantas com diferentes quantidades de nódulos radiculares. Portanto, o efeito da interação raiz-rizóbio poderia ser traduzido simplesmente como o aumento da produção de flores totais encontrado, o que condiz com nossa hipótese original. Em geral, a concentração de proteína dos grãos de pólen pode variar de 3-60% (Roulston e Cane 2000), e, portanto, seria esperado que plantas com maior disponibilidade de nitrogênio, devido à interação raiz-rizóbio, investissem mais na quantidade e qualidade dos grãos de pólen das flores. De fato, Gawata et al. (2003) demonstrou que plantas associadas às bactérias do tipo rizóbio tiveram aumento da dimensão dos grãos de pólen, da taxa de germinação e no comprimento do tubo polínico do que plantas sem a interação. Porém, a partir da nossa amostragem no campo, não foi possível observar esses padrões esperados. A ausência de efeito da inoculação do rizóbio sobre os descritores do pólen pode sugerir que o efeito do rizóbio se dê preponderantemente na escala da planta (ex. número total de flores), e não na escala do grão de pólen, em *C. desvauxii* var. *latistipula*. Alternativamente, a ausência de relação entre a nodulação e os descritores do pólen pode ser devido ao número amostral baixo que não conseguiu descrever bem os descritores dos grãos de pólen entre plantas.

Em *C. desvauxii* var. *latistipula* plantas que produziram mais flores foram mais visitadas pelas abelhas, incluindo às espécies potencialmente polinizadoras que vibraram as anteras e tocaram no estigma das flores, como espécies do gênero *Bombus* sp. Sabe-se que anúncios florais maiores podem atrair mais polinizadores do que anúncios florais menores (Harder e Barret 1996). Mais especificamente, o pólen é a principal fonte de proteínas e lipídios para as abelhas (Feás et al. 2012), e sabe-se que o desenvolvimento corporal das larvas de abelhas nos ninhos pode ser limitado por alimentação pobre em proteína (Roulston e Cane 2000, Quezada-

Euán et al. 2010). A quantidade de proteínas totais nos grãos de pólen poder ser muito variável entre plantas determinando a quantidade e a frequência de visitas realizadas pelas abelhas (Roulston e Cane, 2000), sendo que grãos de pólen mais ricos em proteínas deveriam atrair quantidade maior de abelhas. Nossos resultados ainda não nos possibilitaram descobrir o que de fato pode estar relacionado à maior frequência de visitas de abelhas, se exclusivamente a quantidade total de flores produzidas, ou se também a quantidade e qualidade dos grãos de pólen das anteras.

6. Considerações finais

Custos e benefícios frequentemente variam ao longo do tempo e do espaço para uma dada interação ecológica, levando ao que foi referido como condicionalidade ou dependência do contexto ecológico das interações (Cushman e Whitham 1989). Em particular, o resultado de uma interação potencialmente mutualista frequentemente depende do tamanho ou idade dos seus participantes, dado que a necessidade dos serviços prestados pelo parceiro mutualista, assim como sua capacidade para a disponibilização de recursos, é dependente do seu estágio de desenvolvimento (Bronstein 1994). Em nosso trabalho foi possível concluir que os diferentes estádios ontogenéticos na população da espécie *Chamaecrista desvauxii* var. *latistipula* estão relacionados às diferenças no estabelecimento, manutenção e intensidade das interações mutualistas, evidenciando a importância de considerarmos a ontogenia ao investigarmos as consequências de múltiplas interações mutualistas sobre uma mesma planta. Esse aspecto do nosso trabalho já havia sido destacado a quase duas décadas no artigo clássico da pesquisadora Judie Bronstein (1994): “para entendermos a ecologia das interações mutualistas faz sentido documentarmos o aspecto do estágio específico das interações relativamente pouco estudado, ao invés de calcularmos uma rede de resultados hipotéticos para um indivíduo médio dentro da população”. Ainda, nossos resultados apontam para a existência de interferência entre mutualismos, dado que o aumento na intensidade da interação raiz-rizóbio pode promover mudanças fenotípicas no corpo vegetal e na alocação de recursos, desfavorecendo a interação nectário extrafloral-formiga e favorecendo a interação flor-abelha. Variações na qualidade do solo também parecem interferir no estabelecimento e intensidade das interações raiz-rizóbio em nosso sistema, o que aumenta a complexidade de cenários ecológicos potenciais que poderiam ser encontrados nos habitats e micro-habitats dos ambientes tropicais. Embora nosso trabalho não traga luz sobre os mecanismos intrínsecos da planta associados a dinâmica de carbono e nitrogênio, ele contribui para a incorporação do tempo de desenvolvimento das espécies vegetais no estudo de múltiplos mutualismos, com reflexos em seus custos relativos e benefícios

acumulados. Esses aspectos sugerem que trabalhos futuros focados no estudo de mutualismos múltiplos ou isolados não devem desconsiderar a variação natural de tamanho entre plantas dentro das populações, e que esse aspecto se torna fundamental para a compressão da variação e dinâmica das interações ecológicas em geral.

7. Referências

- Ballhorn, D.J., Kautz, S., Schadler, M., 2013. Induced plant defense via volatile production is dependent on rhizobial symbiosis. *Oecologia*. 172:833-846.
- Barnes, J.D., Balguer, L., Manrique, E., Elvira, S., Davison, A.W., 1992. A reappraisal of the use of DMSO for the extraction and determination of chlorophylls a and b in lichens and higher plants. *Environ. Exper. Bot.* 32:85-100.
- Barton, K.E., Boege, K., 2017. Future directions in the ontogeny of plant defence: understanding the evolutionary causes and consequences. *Ecology Letters*. 20:403-411.
- Boege, K., Marquis, R.J., 2005. Facing herbivory as you grow up: the ontogeny of resistance in plants. *Ecology and Evolution*. 20:441-448.
- Bolker, B., Skaug, H., Magnusson, A., Nielsen, A., 2012. Getting started with the glmmADMB package. Available at glmmadmb.r-forge.r-project.org/glmmADMB.pdf.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 72:248-254.
- Bronstein, J.L., 1994. Conditional outcomes in mutualistic interactions. *Tree*. 9:214-217.
- Bronstein, J.L., 2001. The exploitation of mutualisms. *Ecology letters*, 4:277-287.
- Bronstein, J.L., Alarcón, R., Geber, M., 2006. The evolution of plant-insect mutualisms. *New Phytologist*. 172:412-428.
- Bronstein, J.L., 2015. *Mutualism*, first ed., Oxford University Press, Oxford.
- Buchmann, S.L., 1983. Buzz pollination in angiosperm. In: Little, R.J. (Eds.) *Handbook of experimental pollination biology*. Scientific & Academic Editions, Nova York. 73-113.
- Byk, J., Del-Claro, K., 2011. Ant-plant interaction in the Neotropical savanna: direct beneficial effects of extrafloral nectar on ant colony fitness. *Population Ecology*. 53:327-332.
- Chamberlain, S.A., Holland, J.N., 2009. Quantitative synthesis of context dependency in ant-plant protection mutualisms. *Ecology*, 90:2384-2392.
- Clarholm, M., 1985. Interactions of bacteria, protozoa and plants leading to mineralization of soil nitrogen. *Soil Biology and Biochemistry*, 17:181-187.
- Cunha, A.R., Martins, D., 2009. Classificação climática para os municípios de Botucatu e São Manuel, SP. *Irriga*, 14:01-11.
- Cushman, J., Whitham, T.G., 1989. Conditional mutualism in a membracid-ant association: temporal, age-specific, and density-dependent effects. *Ecology*. 70:1040-1047.

- Dean, J.M., Mescher, M.C., De Moraes, C.M., 2009. Plant–rhizobia mutualism influences aphid abundance on soybean. *Plant and Soil*. 323:187-196.
- Davidson, D.W., 1998. Resource discovery versus resource domination in ants: a functional mechanism for breaking the trade-off. *Ecological Entomology*. 23:484-490.
- Del-Claro, K., Oliveira, P.S., 2000. Conditional outcomes in a neotropical treehopper-ant association: temporal and species-specific variation in ant protection and homopteran fecundity. *Oecologia*. 124:156-165.
- Del-Val, E.K., Crawley, M.J., 2005. Are grazing increaser species better tolerators than decreasers? An experimental assessment of defoliation tolerance in eight *British grassland* species. *Journal of Ecology*. 93:1005-1016.
- Dilworth, M.J., James, E.K., Sprent, J.I., Newton, W.E., 2008. Nitrogen fixation: origins, applications, and research progress, first ed. Springer, Dordrecht.
- Doak, P., Wagner, D., Watson, A., 2007. Variable extrafloral nectary expression and its consequences in quaking aspen. *Can. J. Bot.* 85:1-9.
- Elger, A., Lemoine, D. G., Fenner, M., & Hanley, M. E. (2009). Plant ontogeny and chemical defence: older seedlings are better defended. *Oikos*. 118:767-773.
- Evans, G.C., 1972. The Quantitative analysis of plant Growth, first ed. University of California Press, Berkeley.
- Farji Brener, A.G., Folgarait, P., Protomastro, J., 1992. Asociación entre el arbuso *Capparis retusa* (Capparidaceae) y las hormigas *Camponotus blandus* y *Acromyrmex striatus* (Hymenoptera: Formicidae). *Biol. Trop.* 40, 341-44.
- Farnsworth, E., 2004. Hormones and shifting ecology throughout plant development. *Ecology*. 85:5-15.
- Feás, X., Vázquez-Tato, M.P., Estevinho, L., Seijas, J.A., Iglesias A., 2012. Organic bee pollen: botanical origin nutritional value bioactive compounds antioxidant activity and microbiological quality. *Molecules*. 17:835-837.
- Frederickson, M.E., 2013. Rethinking mutualism stability: cheaters and the evolution of sanctions. *The Quarterly review of biology*. 88:269-295.
- Galetto, L., Bernardello, L.M., 1992. Extrafloral nectaries that attract ants in Bromeliaceae: structure and nectar composition In: Dafni, A., Kevan, P.G., Husband, B.C. (Eds.) *Practical pollination biology*. Enviroquest Ltd., Ontario.
- Gwata, E., Wofford, D., Pfahler, P., Boote, K., 2003. Pollen morphology and in vitro germination characteristics of nodulating and nonnodulating soybean (*Glycine max L.*) genotypes. *Theoretical and Applied Genetics*. 106:837-839.

- Gerber, M.A., 1985. The relationship of plant size to self-pollination in *Mertensia ciliata*. *Ecology*. 66:762-772.
- Glyan'ko, A.K., Vasil'eva, G.G., Mitanova, N.B., Ishchenko, A.A., 2009. The influence of mineral nitrogen on legume-*Rhizobium* symbiosis. *Biology Bulletin*, 36:250-258.
- Godschalx, A.L., Schädler, M., Trisel, J.A., Balkan, M.A., Ballhorn, D.J., 2015. Ants are less attracted to the extrafloral nectar of plants with symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia. *Ecology*. 96:348-354.
- Gottsberger, G., Silberbauer-Gottsberger, I., 1988. Evolution of flower structures and pollination in Neotropical Cassiinae (Caesalpiniaceae) species. *Phyton*. 28:293-320.
- Grillo, M.A., Stinchcombe, J.R., Heath, K.D., 2016. Nitrogen addition does not influence pre-infection partner choice in the legume-*Rhizobium* symbiosis. *American journal of botany*. 103:1763-1770.
- Harder, L.D., Barrett, S.C.H., 1996. Pollen dispersal and mating patterns in animal-pollinated plants, In: Lloyd, D.G., Barrett, S.C.H. (Eds.) *Floral biology*. Springer, Nova York.
- Herns, D.A., Mattson, W.J., 1992. The dilemma of plants: to grow or defend. *The quarterly review of biology*. 67:283-335.
- Ingham, R.E., Trofymow, J.A., Ingham, E.R., Coleman, D.C., 1985. Interactions of bacteria, fungi, and their nematode grazers: effects on nutrient cycling and plant growth. *Ecological monographs*, 55:119-140.
- Irwin, H.S., Barneby, R.C., 1982. The American Cassiinae: a synoptical revision of the leguminosae tribe Cassiinae subtribe Cassiinae in the New World. *The New York Botanical Garden*. 35:637-895.
- Johnson, N.C., Graham, J.H., Smith, F.A. 1997. Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum. *New Phyt*. 135:575-585.
- Jordano, P., Bascompte, J., Olesen, J.M., 2003. Invariant properties in coevolutionary networks of plant-animal interactions. *Ecology Letters*. 6:69-81.
- Keller, K.R., Carabajal, S., Navarro, F., Lau, J.A., 2017. Effects of multiple mutualists on plants and their associated arthropod communities. *Oecologia*, 1-10.
- Kempel, A., Brandl, R., Schädler, M., 2009. Symbiotic soil microorganisms as players in aboveground plant-herbivore interactions: the role of rhizobia. *Oikos*. 118:634-640.
- Kessler, A., Heil, M., 2011. The multiple faces of indirect defences and their agents of natural selection. *Functional Ecology*, 25:348-357.
- Klinkhamer, P.G., de Jong, T.J., de Bruyn, G.J., 1989. Plant size and pollinator visitation in *Cynoglossum officinale*. *Oikos*, 54:201-204.

- Koch, E., Camarota, F., & Vasconcelos, H. L. (2016). Plant ontogeny as a conditionality factor in the protective effect of ants on a Neotropical tree. *Biotropica*. 4:198-205.
- Lambers, H., 1987. Growth, respiration, exudation and symbiotic associations: the fate of carbon translocated to the roots. In: Gregory, J., Lake, J.V., Rose, D.A. (Eds.) *Root Development and Function*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Lange, D., Dattilo, W., Del-Claro, K., 2013. Influence of extrafloral nectary phenology on ant-plant mutualistic networks in a neotropical savanna. *Ecological Entomology*. 38:463-469.
- McKinney, M.L., McNamara, K. J., 1991. *Heterochrony*. Springer. Boston, 1-12.
- McLain, D.K., 1983. Ants, extrafloral nectaries and herbivory on the passion vine, *Passiflora incarnata*. *American Midland Naturalist*. 110:433-439.
- Miller, T.E., 2014. Plant size and reproductive state affect the quantity and quality of rewards to animal mutualists. *Journal of ecology*. 102:496-507.
- Nascimento, E. A., Del-Claro, K., 2010. Ant visitation to extrafloral nectaries decreases herbivory and increases fruit set in *Chamaecrista debilis* (Fabaceae) in a Neotropical savanna. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*. 205:754-756.
- Ness, J.H., Morris, W.F., Bronstein, J.L., 2009. For ant-protected plants, the best defense is a hungry offense. *Ecology*. 90:2823-2831.
- Nogueira, A., Valadão-Mendes, L.B., El-Ottra, J.H.L., Guimarães, E., Cardoso-Gustavson, P., Quinalha, M.M., Paulino, J.V., Rando, J.G. The relationship of floral morphology and development with the pattern of bee visitation in a legume species with pollen-flowers. *Botanical Journal of the Linnean Society*.
- Ochoa-López, S., Villamil, N., Zedillo-Avelleyra, P., Boege, K., 2015. Plant defence as a complex and changing phenotype throughout ontogeny. *Annals of botany*, 116:797-806.
- Peoples, M.B., Pate, J.S., Atkins, C.A., Bergersen, F.J., 1986. Nitrogen nutrition and xylem sap composition of peanut (*Arachis hypogaea*). *Plant Physiology*. 82:946-951.
- Pringle, E.G., 2016. Integrating plant carbon dynamics with mutualism ecology. *New Phytologist*. 210:71-75.
- Quezada-Euán, J.J.G., López-Velasco, A., Pérez-Balam, J., Moo-Valle, H., Velazquez-Madrado, A., Paxton, R.J., 2011. Body size differs in workers produced across time and is associated with variation in the quantity and composition of larval food in *Nannotrigona perilampoides* (Hymenoptera, Meliponini). *Insectes sociaux*. 58:31-38.
- Quintero, C., Barton, K. E., Boege, K., 2013. The ontogeny of plant indirect defenses. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*. 15:245-254.

- Rhoades, D. F., Cates, R. G. (1976). Toward a general theory of plant antiherbivore chemistry, In: Wallace, J.W., Mansell, R.L. (Eds.) Biochemical interaction between plants and insects. Springer, Nova York, 168-213.
- Rico-Gray, V., Oliveira, P.S., 2007. The ecology and evolution of ant-plant interactions, first ed. University of Chicago Press, Chicago.
- Ronen, R., Galun, M., 1984. Pigment extraction from lichens with dimethyl sulfoxide (DMSO) and estimation of chlorophyll degradation. Environmental and Experimental Botany. 24:239-245.
- Roulston, T.H., Cane, J.H., 2000. Pollen nutritional content and digestibility for animals, In: Dafni, A., Hesse, M., Pacini, E. (Eds.) Pollen and Pollination. Springer, Vienna, 187-209.
- R Development Core Team, 2018 'R: A Language and Environment for Statistical Computing.'. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, ISBN 3-900051-07-0. Available at <http://www.R-project.org> (accessed 29.01.18).
- Schaffer, W.M., Schaffer, M.V., 1979. The adaptive significance of variations in reproductive habit in the Agavaceae II: Pollinator foraging behavior and selection for increased reproductive expenditure. Ecology. 60:1051-1069.
- Schmitt, J., 1983. Flowering plant density and pollinator visitation in Senecio. Oecologia. 60:97-102.
- Smith, S.E., Smith, F.A., 2011. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales. Plant biology. 62:227-250.
- Somasegaran, P., Hoben, H.J., 2012. Handbook for rhizobia: methods in legume-*Rhizobium* technology, first ed. Springer, Nova York.
- Sprent, J.I., 2001. Nodulation in legumes, first ed. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Sprent, J.I., 2009. Legume nodulation: a global perspective, first ed. John Wiley & Sons Ltd, Oxford.
- Stout, M.J., Zehnder, G.W., Baur, M.E., 2002. Potential for the use of elicitors of plant resistance in arthropod management programs. Archives of insect biochemistry and physiology. 51:222-235.
- Streeter, J., Wong, P.P., 1988. Inhibition of legume nodule formation and N₂ fixation by nitrate. Critical Reviews in Plant Sciences. 7:1-23.
- Van der Putten, W.H.L., Vet, J.H., Wäckers, F., 2001. Linking above and belowground multitrophic interactions of plants, herbivores, pathogens, and their antagonists. Trends Ecol Evol. 16:547-554.

- Villamil, N., Márquez-Guzmán, J., & Boege, K. (2013). Understanding ontogenetic trajectories of indirect defence: ecological and anatomical constraints in the production of extrafloral nectaries. *Annals of Botany*. 112:701-709.
- Wadgyamar, S.M., Austen, E.J., Cumming, M.N., Weis, A.E., 2015. Simultaneous pulsed flowering in a temperate legume: causes and consequences of multimodality in the shape of floral display schedules. *Journal of Ecology*. 103:316-327.
- Wall, D.H., Moore, J.C., 1999. Interactions underground: soil biodiversity, mutualism, and ecosystem processes. *BioScience*. 49:109-117.
- Weese, D.J., Heath, K.D., Dentinger, B., Lau, J.A., 2015. Long-term nitrogen addition causes the evolution of less-cooperative mutualists. *Evolution*. 69:631-642.
- Weiner, J., 2004. Allocation, plasticity and allometry in plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*. 6:207-215.
- Wooley, S.C., Donaldson, J.R., Gusse, A.C., Lindroth, R.L., Stevens, M.T., 2007. Extrafloral nectaries in aspen (*Populus tremuloides*): heritable genetic variation and herbivore induced expression. *Ann. Bot.–London*. 100:1337-1346.

Tabelas

Tabela 1. Média e desvio padrão dos descritores do corpo vegetal em plantas juvenis que ainda não entraram no estágio reprodutivo, e plantas reprodutivas produtoras de flores e frutos. Asteriscos indicam quando detectamos diferença significativa entre os dois grupos de plantas ($p < 0.05$). (NA = *not available*, Min = mínimo, Max = máximo).

Estádio de desenvolvimento	Unidade de tamanho Média (Min-Max)	N amostral	Biomassa total (g)	Razão C/N das folhas (%)	Razão C/N das raízes (%)	Clorofila (mg/g)	Proteínas solúveis totais das folhas ($\mu\text{g/g}$)	Conteúdo total de açúcares do néctar extrafloral (mg/ μl)	Proteínas solúveis totais dos grãos de pólen ($\mu\text{g/g}$)
Planta juvenil	38 (4-132)	12	4,7 \pm 6,6*	10,5 \pm 9,7	31,7 \pm 5,5	1,5 \pm 0,2	57,4 \pm 9,7	0,5 \pm 0,7	NA
Planta reprodutiva	418 (37-888)	7	84,3 \pm 66,4*	12,9 \pm 6,1	38,2 \pm 6,6	2,1 \pm 0,5	65,9 \pm 22,05	0,2 \pm 0,2	205,3 \pm 39,2

Tabela 2. Média e desvio padrão dos descritores das interações mutualistas em plantas juvenis que ainda não entraram no estágio reprodutivo, e plantas reprodutivas produtoras de flores e frutos. Asteriscos indicam quando detectamos diferença significativa entre os dois grupos de plantas ($p < 0.05$). (NA = *not available*; Min = mínimo; Max = máximo).

Estádio de desenvolvimento	Unidade de tamanho Média (Min-Max)	N amostral	Número de nódulos radiculares	Dias de observação de formigas por planta	N. de visita de formigas por planta	N. de visita de formigas por ramo	Dias de observação de abelhas por planta	N. de visita de abelhas por planta
Planta Juvenil	38 (4-132)	12	86,8 ± 135,3	12	26,6 ± 29,4	21,7 ± 19,6	NA	NA
Planta Reprodutiva	418 (37-888)	7	217,7 ± 132,5	12	75,6 ± 63,04	71,7 ± 11,1	10	7,7 ± 11,1

Tabela 3. Visitantes florais de *Chamaecrista desvauxii* var. *latistipula* e os descritores de comportamento de cada morfoespécie. O número de flores visitadas e vibrações foi quantificado considerando o intervalo de pico de visitação de abelhas entre 6h30 min a 7h (de 30 min). (NA = not available; Q= quartil; Min = mínimo; Max = máximo).

Visitantes florais	N	Número de visitas por flor (por 30min)			Número de vibrações (por 30 min)			Contato com estruturas reprodutivas		
		Média (Min-Max)	1Q	3Q	Média (Min-Max)	1Q	3Q	Anteras (comportamento)	Estigma	Potencial polinizador?
<i>Bombus</i> sp.	110	11 (0-30)	0	11	64 (9-204)	16	165	Sim (vibração)	Sim	Sim
<i>Apis</i> sp.	1	<1 (0-1)	0	0	NA	NA	NA	Não	Eventualmente	Não
<i>Megalopta</i> sp.	4	0 (0-2)	0	0	20 (5-24)	19	22	Sim (vibração)	Sim	Sim
<i>Oxaea</i> sp.	11	1 (0-10)	0	<1	26 (2-98)	7	43	Sim (vibração)	Sim	Sim
<i>Melipona</i> sp.	13	1,5(0-10)	0	0	NA	NA	NA	Não	Eventualmente	Sim

Figuras e Gráficos

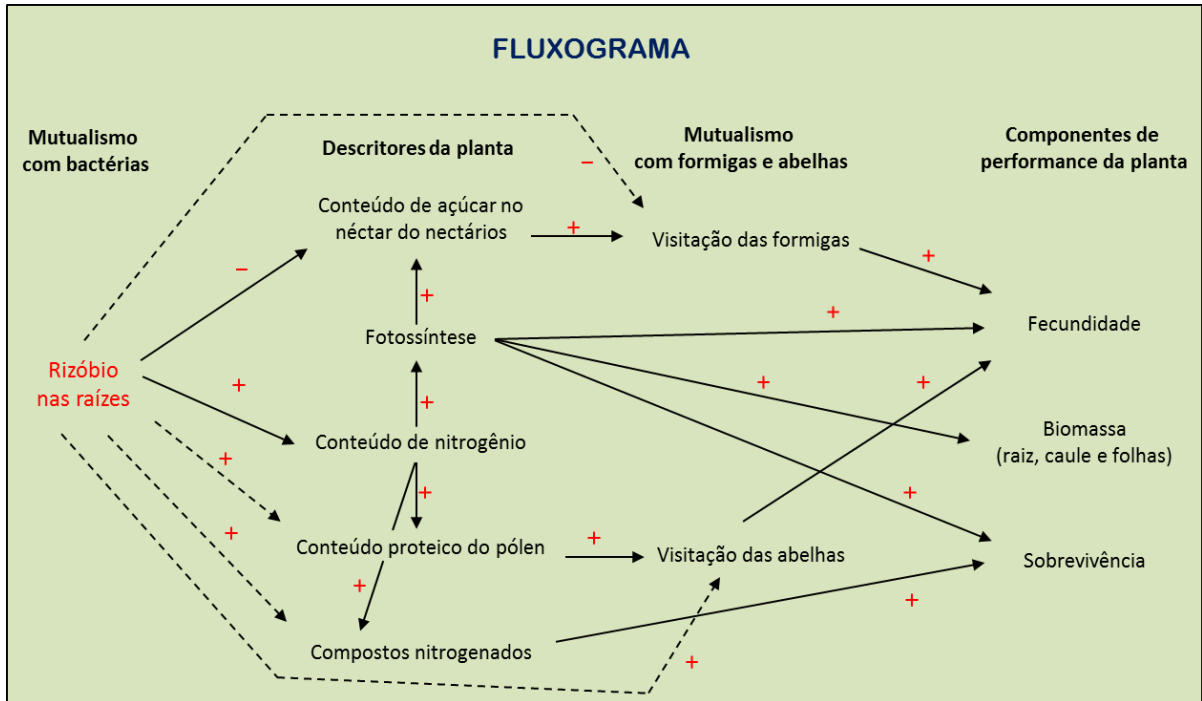


Fig. 1. Hipóteses sobre o efeito direto e indireto da interação raiz-rizóbio sobre os demais mutualismos: efeito negativo sobre as formigas protetoras pela diminuição do açúcar no néctar, e efeito positivo sobre as abelhas polinizadoras pelo aumento da quantidade de proteínas nos grãos de pólen. Os efeitos diretos estão representados por setas com linhas contínuas, e os efeitos indiretos estão representados com setas com linhas tracejadas.

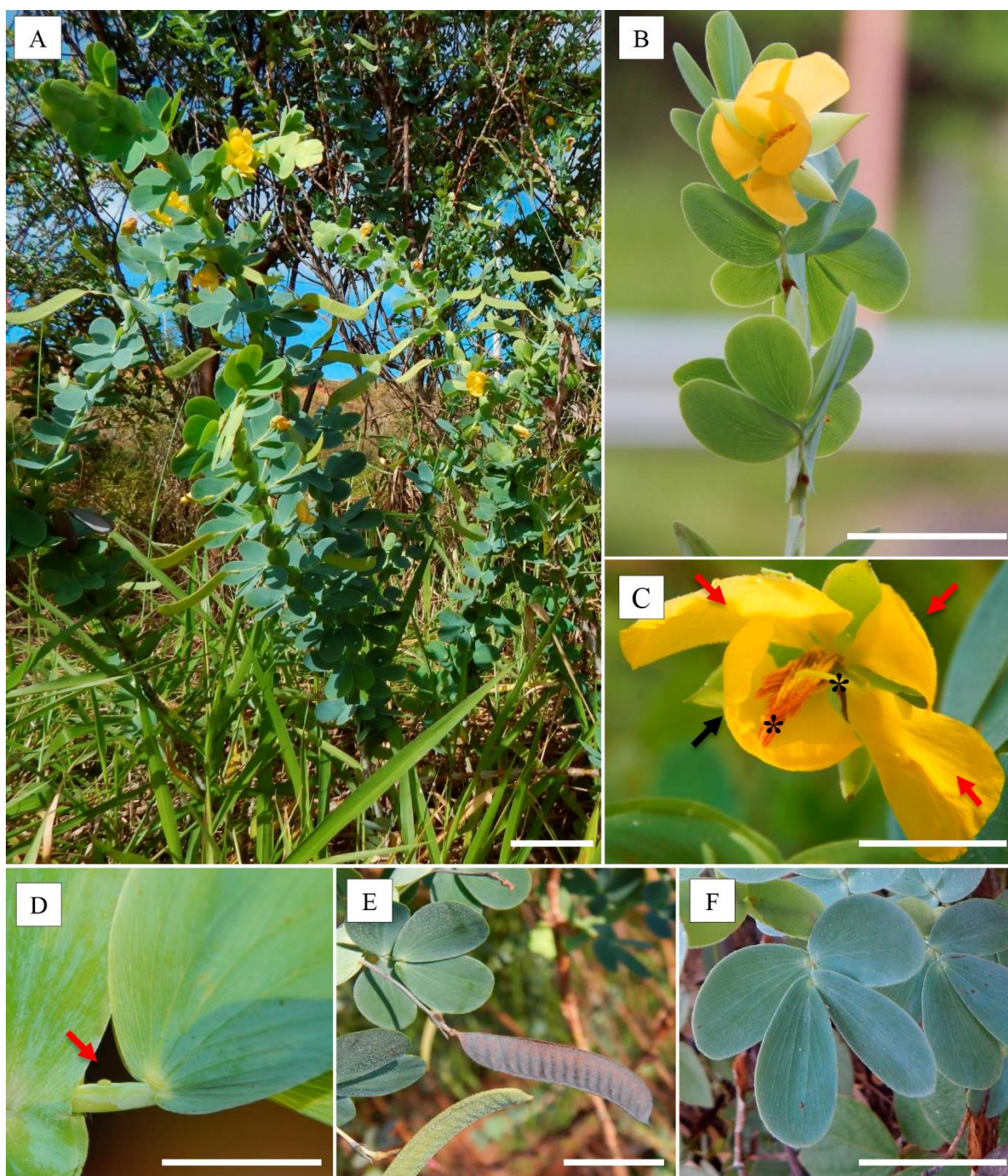


Fig. 2. Detalhes da morfologia da espécie focal deste estudo *Chamaecrista desvauxii* var. *latistipula*. (A) Hábito arbustivo de *C. desvauxii* var. *latistipula* no período de floração e frutificação. Escala = 5cm. (B) Hábito arbustivo de detalhe de um ramo com uma flor aberta. Escala = 3 cm. (C) Detalhes da organização da flor – quatro pétalas menores (setas vermelhas), uma pétala maior (seta preta), órgãos reprodutivos (asterisco preto). Escala = 1,5 cm. (D) Nectário extrafloral no pecíolo da folha (seta vermelha). Escala = 2,5cm. (E). Detalhes do fruto tipo legume. Escala = 2,5cm. (F) Folha composta por quatro folíolos. Escala = 2,5cm.



Fig. 3. Detalhe das plantas de *C. desvauxii* var. *latistipula* cultivadas em casa de vegetação, parte da etapa experimental deste trabalho. (A) Detalhe da disposição dos 60 vasos dentro da casa de vegetação no início do experimento. Escala = 12 cm. (B) Plantas com inoculação das bactérias do tipo rizóbio – a esquerda planta em solo MO, e a direita planta em areia. Escala = 12 cm. (C) Plantas sem a inoculação de bactérias – a esquerda planta em areia, e a direita planta em solo MO. Escala = 12 cm. (Solo MO = solo rico em matéria orgânica).

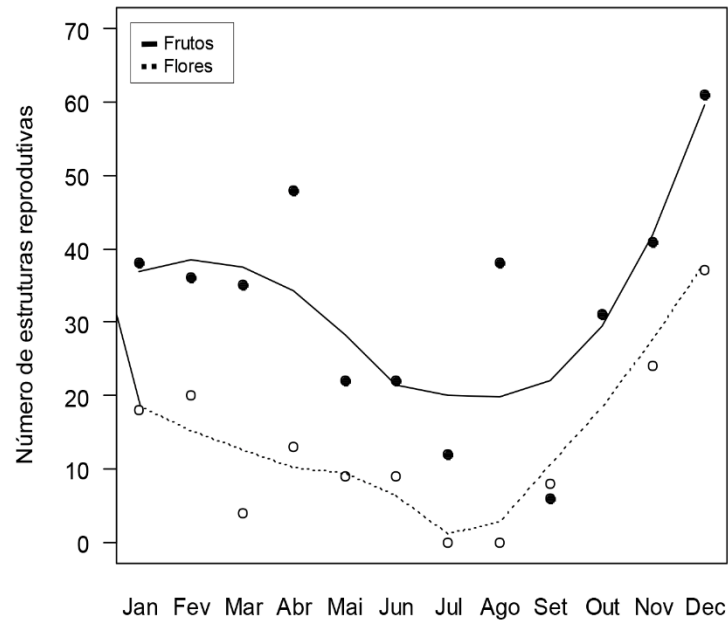


Fig. 4. Padrão fenológico da população de *C. desvauxii* var. *latistipula* da área de estudo. Linha direta representa o número total de frutos produzido por planta por mês e linha tracejada representa o número total de flores produzidas por planta por mês.

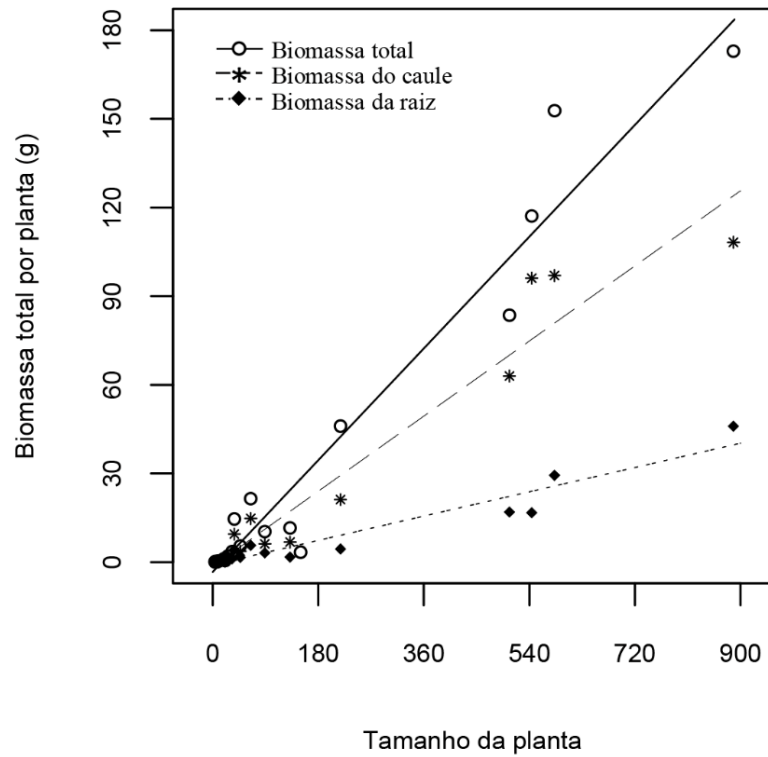


Fig. 5. Relação entre a variação da biomassa seca (g) e unidade de tamanho (descriptor do tamanho da parte aérea da planta) entre os indivíduos de *C. desvauxii* var. *latistipula*. Destacamos aqui essa relação utilizando a biomassa seca total (linha contínua; $F_{(1,17)} = 326.7$, $p < 0.001$), biomassa seca caule (linha tracejada; $F_{(1,16)} = 295.9$, $p < 0.001$) e biomassa seca raiz (linha pontilhada; $F_{(1,16)} = 203.8$, $p < 0.001$).

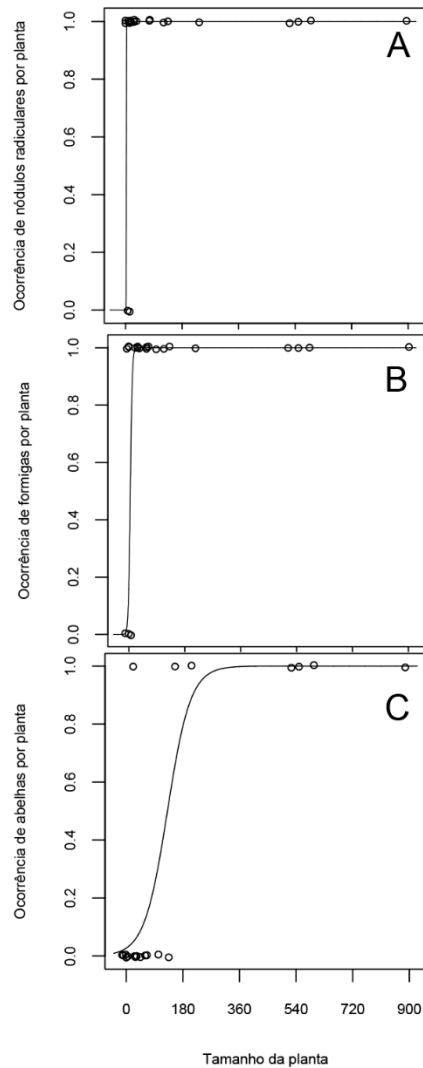


Fig. 6. Ocorrência dos mutualismos em diferentes unidades de tamanho em plantas de *C. desvauxii* var. *latistipula* no campo; (A) Ocorrência de nódulos radiculares de bactérias do tipo rizóbio ($F_{(1,26)} = 4.26$, $p = 0.049$). (B) Ocorrência de formigas ($F_{(1,26)} = 5.05$, $p = 0.03$). (C) Ocorrência de abelhas ($F_{(1,26)} = 38.7$, $p < 0.001$).

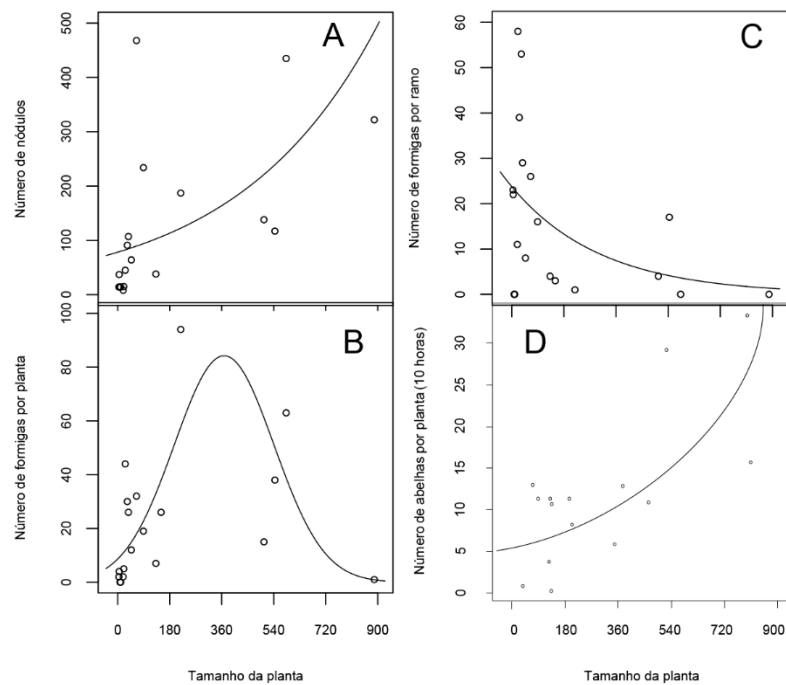


Fig. 7. Variação dos mutualismos em diferentes unidades de tamanhos em planta de *C. desvauxii* var. *latistipula*; (A) Número de nódulos radiculares de bactérias do tipo rizóbio por planta ($F_{(1,17)} = 8.0$, $p = 0.01$). (B) Número de abelhas por planta ($F_{(1,16)} = 18.6$, $p < 0.001$). (C) Número de formigas em toda a planta ($F_{(1,17)} = 9.3$, $p = 0.007$). (D) Número de formigas por ramo focal por planta ($F_{(1,18)} = 5.6$, $p = 0.02$).

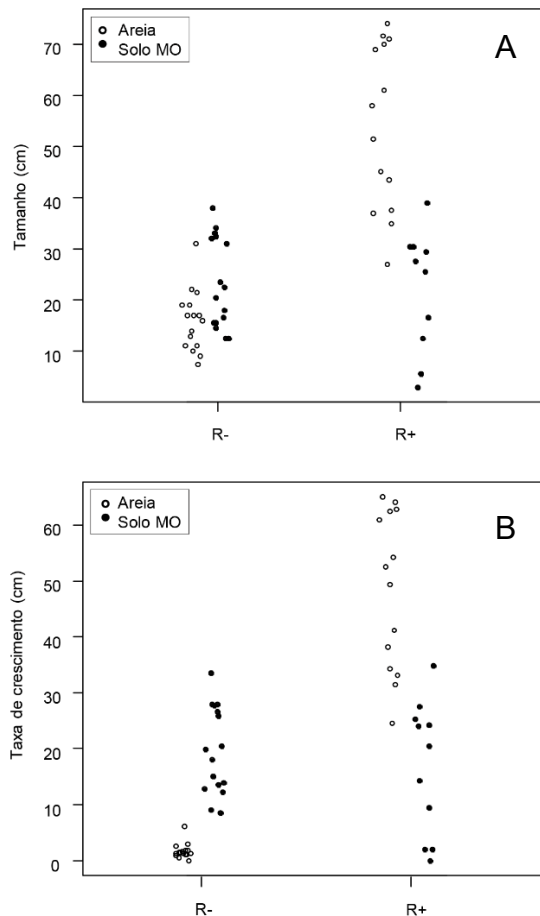


Fig. 8. Efeito da interação mutualista raiz-rizóbio e do tipo de solo sobre o desenvolvimento das plantas em casa de vegetação de *C. desvauxii* var. *latistipula*; (A) A presença de rizóbio teve um efeito positivo sobre a altura das plantas, mas esse efeito foi variável de acordo com o tipo de solo em que as plantas foram cultivadas (efeito da interação rizóbio*solo; $z = 7.99$, $p = 0.0004$, $N = 57$). Quando contrastamos diretamente as quatro condições experimentais, as plantas em areia com rizóbio tiveram a maior altura ($p < 0.05^*$), enquanto que as plantas em solo MO com e sem rizóbio tiveram alturas semelhantes ($p = 0.90^*$), e as plantas em areia com rizóbio foram menores somente quando comparadas com as plantas em areia sem rizóbio ($p < 0.001^*$) mas não com as plantas em solo MO. (B) A presença de rizóbio teve um efeito positivo sobre a taxa de crescimento das plantas, mas esse efeito foi variável de acordo com o tipo de solo em que as plantas foram cultivadas (efeito da interação rizóbio*solo; $z = 10.56$, $p < 0.001$, $N = 57$). Quando contrastamos diretamente as quatro condições experimentais, as plantas em areia com rizóbio tiveram a maior taxa de crescimento ($p < 0.05^*$), enquanto que as plantas em solo MO com e sem rizóbio tiveram taxas de crescimento semelhantes ($p = 0.90^*$), e as plantas em areia sem rizóbio tiveram a menor taxa de crescimento do que todas as demais ($p < 0.05^*$). *Teste posthoc de Tuckey, $\alpha = 0.05$.

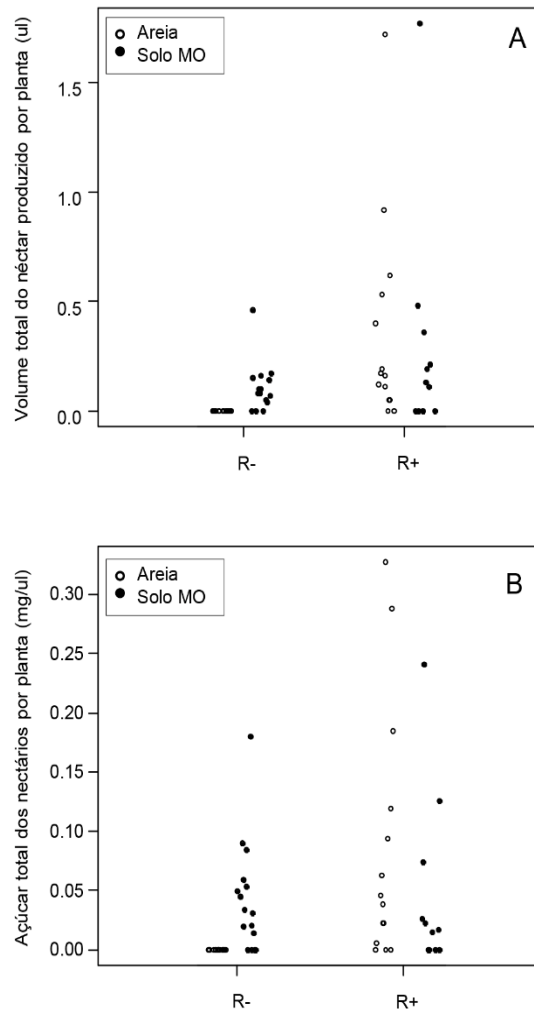


Fig. 9. Relação entre a interação mutualista raiz-rizóbio e os recursos das plantas em casa de vegetação de *C. desvauxii* var. *latistipula*; (A) A presença de rizóbio teve um efeito positivo sobre o volume do néctar produzido pelas plantas, mas esse efeito foi variável de acordo com o tipo de solo em que as plantas foram cultivadas (efeito da interação rizóbio*solo; $z = 2.68$, $p = 0.007$, $N = 57$). Quando contrastamos diretamente as quatro condições experimentais, as plantas em areia sem rizóbio não secretaram néctar nos nectários extraflorais das folhas e foram distintas ($p < 0.05^*$), enquanto que as plantas das demais condições experimentais secretaram volumes totais de néctar por planta semelhantes ($p > 0.30^*$). (B) A presença de rizóbio teve um efeito sobre o conteúdo total de açúcar secretado pelos nectários extraflorais por planta, mas esse efeito foi variável de acordo com o tipo de solo em que as plantas foram cultivadas (efeito da interação rizóbio*solo; $z = 3.51$, $p < 0.001$, $N = 57$). Quando contrastamos diretamente as quatro condições experimentais, as plantas em areia sem rizóbio não secretaram néctar ($p < 0.05^*$), enquanto que as plantas nas demais condições secretaram quantidades de açúcar semelhantes ($p > 0.60^*$). *Teste posthoc de Tuckey, $\alpha = 0.05$.

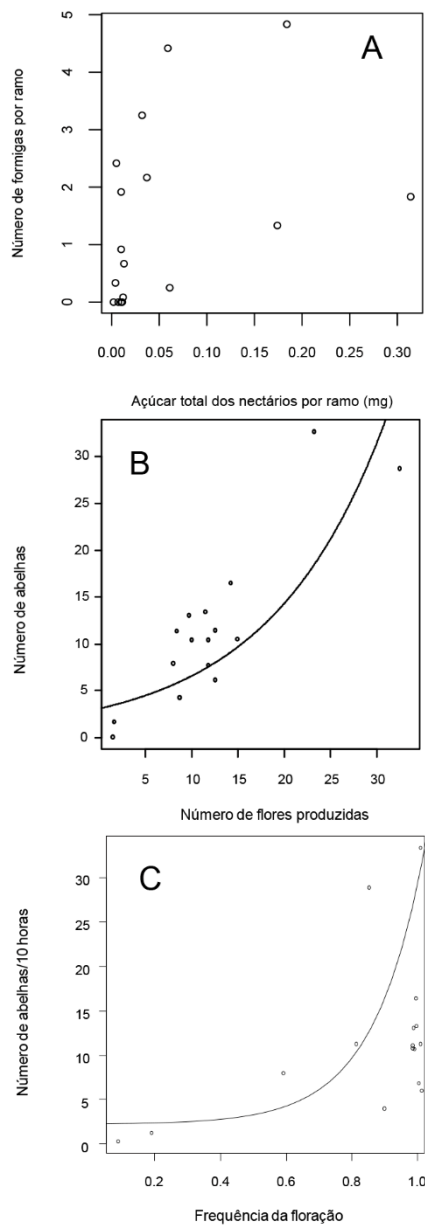


Fig. 10. Relação entre os recursos das plantas e a assembléia de formigas e abelhas em *C. desvauxii* var. *latistipula*; (A) Relação entre os açúcares totais dos nectários e o número de formigas visitantes por ramo focal por planta ($F_{(1,15)} = 3.4$, $p = 0.08$). (B) Relação entre o número total de flores produzidas e o número de abelhas visitantes ($F_{(1,16)} = 270$, $p < 0.01$). (C). Relação entre a frequência de floração ao longo do tempo e o número de abelhas visitando flores ($F_{(1,16)} = 93.9$, $p < 0.001$). Essa última relação considerou 10 dias distintos de observação ao longo de um mês.



Fig. 11. Interações mutualistas estabelecidas em indivíduos de *C. desvauxii* var. *latistipula*; (A) Detalhe de nódulos radiculares presentes nas raízes. Escala = 1cm. (B) Espécies de formigas forrageando o nectário de uma planta em campo. Escala = 1 cm. (C) Detalhe de um visitante floral, *Bombus* sp., visitando uma flor. Escala = 1 cm.