

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 01/03/2020.

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).

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.